



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**DERIVADOS SINTÉTICOS DO ÁCIDO GÁLICO: COMPOSTOS DE BAIXA
TOXICIDADE E IMPORTANTES PROPRIEDADES ANTITUMORAIS EM
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

CLAUDRIANA LOCATELLI

Florianópolis - SC, SETEMBRO, 2009.

CLAUDRIANA LOCATELLI

**DERIVADOS SINTÉTICOS DO ÁCIDO GÁLICO: COMPOSTOS DE BAIXA
TOXICIDADE E IMPORTANTES PROPRIEDADES ANTITUMORAIS EM
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmácia. Área de concentração: **Fármacos e Medicamentos**. Linha de Pesquisa: **Investigação de produtos naturais com potencial atividade biológica**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Florianópolis - SC, SETEMBRO, 2009.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança”. *Albert Einstein.*

AGRADECIMENTOS

Após todo o tempo e esforço empregados durante todo este período, o mais árduo foi encontrar palavras certas para agradecer às pessoas especiais que fazem parte da minha vida, e sem as quais eu jamais teria chegado até aqui. Agradeço neste momento, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e de forma especial deixo aqui registrado meu profundo agradecimento:

A DEUS, pela vida, pelos meus objetivos já alcançados e por estar sempre iluminando meu caminho.

À minha família pelo apoio, em especial a minha mãe Mariluci, pelo carinho, dedicação, tempo, confiança e incentivo depositados em mim desde o princípio. Agradeço também por todo sacrifício despendido na minha educação moral e intelectual e que foram fundamentais na construção do meu conhecimento e na minha formação.

Ao meu noivo, Rafael, por seu amor, apoio, incentivo e compreensão.

À minha orientadora, Profa Tânia Beatriz Crecznski Pasa pela oportunidade, pelo esforço dedicado, pela confiança, pela paciência, pela amizade e por todos os ensinamentos transmitidos. A você minha gratidão e admiração pela pessoa que é e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Prof Celso Pilatti, pelas sugestões e dedicação durante a avaliação histológica.

Ao Prof Rosendo A. Yunes e seus alunos Paulo Cesar Leal e Alessandra Mascarello, pela colaboração e síntese dos galatos utilizados neste trabalho.

A Profa Maria Cláudia, pela colaboração no início do trabalho com cultura celular.

A Profa Maria Luiza, pelas contribuições durante a realização dos experimentos.

À minha amiga Andrea Rodrigues que me acolheu com muito carinho em sua casa durante todos estes anos de realização deste trabalho, pela amizade e pelos momentos de descontração imprescindíveis para vida cotidiana.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, inclusive aqueles que já seguiram seus caminhos, pelo carinho, amizade, conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração durante nosso período de convívio.

À Andréia Lilian Formento Navarini, pelo auxílio, amizade, carinho e pelas boas conversas durante a realização deste trabalho.

À Vânia Noldin e Clarissa Cordova, em reconhecimento pelas valiosas sugestões oferecidas, fundamentais para realização deste trabalho e principalmente pela amizade, essencial para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade de fazer a leitura desta tese e compor a banca.

Ao Hospital Universitário, pela disponibilidade da estrutura para realização de parte deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter proporcionado a realização desta minha formação acadêmica e científica.

A Universidade do Contestado Campus Caçador, pela liberação de parte das minhas horas de trabalho na instituição e auxílio financeiro importantes para realização deste trabalho.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O câncer corresponde a um grupo de várias doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células anormais e que pode ocorrer em qualquer local do organismo. A taxa de mortalidade associada ao câncer vem crescendo nos últimos anos em função do envelhecimento populacional, do processo de industrialização e das mudanças de hábitos de vida. Atualmente o câncer é considerado um problema de saúde pública e esforços vem sendo realizados para a prevenção e cura de pacientes acometidos pelas diversas formas da doença. As neoplasias mais freqüentes na infância são as leucemias, tumores do sistema nervoso central e linfomas, enquanto nos adultos os cânceres de maior incidência são os de próstata, mama e pulmão. No entanto, a incidência do câncer de pele vem crescendo mundialmente nas últimas décadas, superando em algumas partes do mundo o câncer de mama, próstata e pulmão, tornando-se um grave problema de saúde pública, uma vez que interfere na qualidade de vida da população. As terapias empregadas para o tratamento do câncer são a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, a hormonioterapia e a cirurgia, sendo a quimioterapia a modalidade mais utilizada. Todavia, os fármacos quimioterápicos são pouco seletivos, sendo tóxicos aos tecidos sadios, principalmente àqueles de rápida proliferação celular. Nos últimos anos a pesquisa de novos fármacos para o tratamento do câncer tem sido intensificada, principalmente no estudo de compostos de ocorrência natural. O ácido gálico e seus derivados são ácidos fenólicos de ocorrência natural que apresentam uma grande variedade de ações biológicas. Estudos epidemiológicos indicam que compostos fenólicos encontrados na dieta reduzem muito os riscos de incidência de doenças como a aterosclerose, as neurodegenerativas, câncer entre outras. Alterações químicas em moléculas como o ácido gálico podem modificar as propriedades farmacodinâmicas, alterando a solubilidade e o coeficiente de partição, conseqüentemente suas propriedades biológicas. Neste estudo investigamos o potencial antitumoral de derivados ésteres do ácido gálico, moléculas de 0 a 16 carbonos na cadeia lateral. Esta alteração na cadeia carbônica altera a lipossolubilidade do ácido gálico e de seus n-alkil-ésteres bem como os respectivos mecanismos de ação, como foi observado no efeito citotóxico e na depleção de glutathione em células de melanoma (B16-F10) e de leucemia (L1210). Todos os compostos induziram citotoxicidade dependente de concentração. A maior citotoxicidade foi observada com os galatos mais lipofílicos. Os valores de IC_{50} obtidos estão na faixa de micromolar. Todos os compostos causaram fragmentação do DNA após 24 h de incubação. Os resultados sugerem que os n-alkil-ésteres do ácido gálico são capazes de promover morte celular por apoptose e que este fenômeno é dependente do tamanho da cadeia carbônica. Os compostos mais lipofílicos também depletaram os níveis de glutathione intracelular e causaram um potente estresse oxidativo, além de promoverem a ativação do fator NF- κ B e inibirem a expressão de moléculas de adesão. Foi observado que o decil e o tetradecil galatos são mais potentes e que o tetradecil apresenta importante atividade antimetastática e baixa toxicidade em estudos *in vivo*. Através da análise dos resultados obtidos pode-se inferir que os derivados do ácido gálico aqui estudados podem vir a ser uma importante estratégia terapêutica no tratamento tanto de leucemias quanto de melanomas.

Palavras-chave: ácido gálico, galatos, leucemia, melanoma, efeito antitumoral

ABSTRACT

Cancer is a group of several diseases that have in common the uncontrolled proliferation of abnormal cells and can occur anywhere in the body. The mortality rate associated with cancer has been growing in recent years in light of population aging, the process of industrialization and the changes in living habits. Currently, cancer is considered a public health problem and efforts are being made for prevention and cure of the patients undergo by various forms of the disease. The most frequent childhood cancers are leukemias, central nervous system tumors and lymphomas, while in adults the incidence of cancers are those of prostate, breast and lung. However, the incidence of skin cancer is increasing worldwide in recent decades, surpassing in some parts of the world breast cancer, prostate and lung, interfering with the life quality of the population. The therapies used to treat cancer are radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, hormone therapy and surgery, being the chemotherapy the modality most used. However, the chemotherapeutic drugs are poorly selective and are toxic to healthy tissues, especially those of rapid cell proliferation. In recent years the research on new drugs for cancer treatment has been intensified, especially in the study of natural occurring compounds. The gallic acid and its derivatives are phenolic acids, found very commonly in plants with a variety of biological actions. Epidemiological studies indicate that phenolic compounds found in diet greatly reduce the risk of incidence of diseases such as atherosclerosis, the neurodegeneratives, cancer among others. Chemical changes in molecules such as gallic acid may alter the pharmacodynamic properties, changing the solubility and partition coefficient, therefore its biological properties. In this study ester derivatives of gallic acid, molecules from 0 to 16 carbons in the side chain as potential antitumoral molecules were investigated. This alteration in the molecules changes their solubility and also their mechanisms of action, as observed in the cytotoxic effect and the depletion of glutathione in melanoma cells (B16-F10) and leukemia (L1210). Although all compounds induced concentration-dependent cytotoxicity, the highest cytotoxicities were observed with more lipophilic gallates. The IC_{50} values obtained are in the micromolar range. All compounds caused DNA fragmentation after 24 h of incubation. The results suggest that n-alkyl esters of gallic acid are able to promote cell death by apoptosis and that this phenomenon is dependent on the size of the carbon chain. The more lipophilic compounds also depleted the levels of intracellular glutathione and caused a potent oxidative stress. Additionally the compounds promoted the activation of NF- κ B factor and inhibited the expression of adhesion molecules. We observed that decyl and tetradecyl gallates were more potent ones and that tetradecyl showed important antimetastatic activity and low toxicity in vivo studies. Through the analysis of the results we can suggest that the gallic acid derivatives studied here may be in a future an important therapeutic strategy in the treatment of leukemia and melanomas.

Key-words: gallic acid, gallates, leukemia, melanoma, antitumoral effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presença de blastos leucêmicos no sangue periférico.....	15
Figura 2. A - Carcinoma basocelular e B – Carcinoma epidermóide.....	18
Figura 3. Melanoma maligno.	20
Figura 4. Mecanismos de morte celular: apoptose.....	27
Figura 5. As duas principais vias apoptóticas. Na via mitocondrial o estresse celular induz a translocação de membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos do citosol para a mitocôndria, onde induzem a saída do citocromo c. O citocromo c no citosol promove a ativação do Apaf-1 e da pró-caspase 9, formando o apoptossoma, o qual ativa a pró-caspase 3, induzindo à apoptose. O citocromo c e o Smac/DIABLO são liberados da mitocôndria após estímulos apoptóticos. Enquanto o citocromo c ativa o Apaf-1, o Smac/DIABLO inibe a ligação das caspases as IAPs (Proteínas Inibidoras da Apoptose). A segunda via é dependente do receptor. A ativação da pró-caspase 8 pela ligação ao receptor de morte está ilustrada. O Fas-ligante (FasL) associa-se a FAAD na região intracelular. Este complexo ativa a pró-caspase 8. A caspase-8 ativada pode ativar diretamente a procaspase-3 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid, a qual subsequente induz a saída do citocromo c.....	29
Figura 6. Defesas antioxidantes	35
Figura 7. Moléculas de adesão celular.....	37
Figura 8. Estrutura química do ácido gálico	42
Figura 9. Estrutura química dos galatos sem ação citotóxica.....	105

LISTA DE TABELA

TABELA 1. ESTRUTURA QUIMICA E VALORES DE $C \log P$ DOS <i>N</i> -ALQUIL- GALTOS ESTUDADOS.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
APAF-1	Fator ativador de proteases – 1
ATP	Adenosina trifosfato
B16-F10	Linhagem de células de melanoma murino
B16	Linhagem de células de melanoma murino
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
BFM	Berlim-Frankfurt-Munique
CAMs	Moléculas de adesão celular
CAT	Catalase
CEM	Linhagem de células de leucemia linfóide aguda humana
Cys	Cisteína
COX-2	Ciclooxigenase-2
DD	Domínio de morte
DED	Domínio efetor de morte
DISC	Complexo de indução da sinalização da morte
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
FAAD	Proteína adaptadora associada à proteína Fas
Faz	Receptor de superfície celular
Gly	Glicina
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione forma oxidada
GST	Glutathione S-transferase
Glu	Glutamato
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica humana
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1

LLA	Leucemia Linfóide Aguda
L1210	Linhagem de leucemia linfóide aguda muriana
LO_2^{\bullet}	Radical peroxil lipídico
L5178	Linhagem de células de linfoma murino
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
O_2^{\bullet}	Radical ânion superóxido
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PKC	Proteína C quinase
RO_2^{\bullet}	Radical peroxil
SNC	Sistema Nervoso Central
Smac	Ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria
SOD	Superóxido dismutase
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
Vero	Linhagem de células epiteliais de rim de macaco
γ GCS	Gama glutamilcisteina sintetase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 DOENÇAS TUMORAIS.....	13
1.1.1 Aspectos Gerais	13
1.1.2 Leucemia Linfóide Aguda.....	15
1.1.3 Melanoma.....	18
1.2 APOPTOSE - IMPORTANTE ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO	25
1.3 POTENCIAL ENERGÉTICO E REDOX	33
1.4 MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR	37
1.5 NOVAS ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO ANTITUMORAL	40
2. OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL.....	46
2.1.1 Objetivos Específicos	46
3. RESULTADOS	47
3.1 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	48
3.1.1 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	49
3.1.1.1 Efeito Antitumoral do Ácido Gálico e <i>n</i> -alquil Ésteres em diferentes linhagens celulares	49
3.1.1.2 Artigo 1	49
3.1.1.3 Artigo 2.....	59
3.1.2 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	70
3.1.2.1 Efeito Antimetastático e inibição da expressão de moléculas de adesão do tetradecil galato.....	70
3.1.2.2 Artigo 3.....	70
4. DISCUSSÃO	103
5. CONCLUSÕES	114
6. PERSPECTIVAS.....	117
7. REFERÊNCIAS	119
8. ANEXOS	131
8.1 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS.....	132
8.2 DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO	134
8.2.1 Participação em Bancas de Trabalhos Conclusão de Curso.....	135
8.2.2 Participação em Banca de Comissão Julgadora	137
8.2.3 Orientação de Monografia de Curso de Especialização.....	137
8.2.4 Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso	138
8.2.5 Orientação de Iniciação Científica na UnC.....	138

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS TUMORAIS

1.1.1 Aspectos Gerais

O Câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer é o termo comum para todos os tumores malignos. Apesar da origem desta palavra ser relativamente incerta, provavelmente deriva do termo câncer, que em latim, significa carangueijo. Presumivelmente a origem da palavra câncer para a doença deve a ramificação, que se assemelha a morfologia do carangueijo (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

Câncer é definido como uma enfermidade multicausal crônica, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células. A prevenção do câncer tem tomado uma dimensão importante no campo da ciência, uma vez que recentemente foi apontada como a primeira causa de mortalidade no mundo (WHO, 2004).

As causas primárias do câncer são variadas e ainda não estão muito bem esclarecidas, no entanto é sabido que as neoplasias originam-se a partir de mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos, as quais promovem alterações no ciclo celular e, como consequência, elevação na taxa de proliferação e desregulação no processo de morte celular programada. Em geral, a formação do câncer dá-se lentamente e é o ponto final de um processo que passa por várias etapas antes de formar a massa tumoral. Estas fases compreendem de:

- 1) fase de iniciação, quando as células sofrem o efeito do agente carcinogênico, que promove alterações em alguns genes, sem detecção clínica do tumor;

- 2) fase de promoção, em que a célula transformada é modificada em célula maligna, lenta e gradualmente;

- 3) fase de progressão, caracterizada pela multiplicação descontrolada e irreversibilidade do processo. Uma vez nesta fase, o câncer já encontra-se instalado e evolui até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano o câncer é diagnosticado em mais de onze milhões de pessoas e promove a morte de cerca de sete milhões em todo o mundo. Nos países desenvolvidos, atualmente e em média, cerca de uma pessoa em cinco morre de câncer. Esta proporção nos países em desenvolvimento é de uma morte para cada 15 indivíduos, isto se deve a estrutura etária mais jovem destes países (WHO, 2004). Em alguns países o câncer já assumiu o papel de principal causa de morte. O Brasil deverá seguir esta tendência, no entanto as escassas estatísticas disponíveis não permitem visualizar adequadamente a dimensão e o perfil de distribuição do câncer na população brasileira (WÜNSCH FILHO & MONCAU, 2002).

Em 1995, foram registrados no Brasil 98.795 mortes por câncer, sendo que as taxas de mortalidade por todos os tipos da doença são maiores na região Sul e Sudeste (WÜNSCH FILHO & MONCAU, 2002).

Com base em informações da Internacional Agency for Research on Cancer, estima-se que em 2030 o número de mortes por câncer no mundo será de 15 milhões de pessoas (PARKIN, 2002). Os tipos mais comuns de câncer no sexo masculino são os de pulmão, estômago, cólon e reto, próstata, boca e faringe, fígado e bexiga. As mulheres são mais atingidas pelos cânceres de mama, colo de útero, cólon e reto, estômago, pulmão, boca e faringe, ovário e endométrio (PARKIN, 2002).

Nos países em desenvolvimento as taxas de mortalidade por câncer nos anos de 1985 e 1997 foram menores do que nos países desenvolvidos, no entanto existe uma expectativa de aumentar, de 5,4 milhões em 2000, para 9,3 milhões em 2020, de acordo com projeções populacionais (PARKIN, 2002).

Apesar da prevalência dos cânceres de próstata e pulmão no sexo masculino e de mama e colo de útero no sexo feminino, outros tipos de cânceres vêm adquirindo grande importância médica. Dentre estes se destaca as leucemias agudas e melanoma. Isto se deve ao aumento da incidência nas últimas décadas e principalmente pelo mau prognóstico, o qual está relacionado diretamente com as dificuldades e deficiências das terapias atuais.

De acordo com o estudo realizado por Wunsch Filho e Moncau (2002), as mortes por melanoma no Brasil tiveram uma variação porcentual positiva entre 1980

e 1995 tanto em homens com 25% de aumento, quanto em mulheres com 33% de aumento. A leucemia, no entanto, mostrou uma variação porcentual negativa tanto em homens quanto em mulheres nos anos de 1980 e 1995.

1.1.2 Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

No Brasil, assim como em outros países, a Leucemia representa numericamente cerca de 2% de todos os tipos de câncer, sendo uma das poucas neoplasias que atinge não só adultos e idosos como também menores de 14 anos. A Leucemia Linfóide Aguda, por exemplo, é o câncer de maior incidência em crianças, principalmente na faixa de 3 a 5 anos (LAKS et al., 2003).

Nas leucemias agudas há o predomínio de progenitores da linhagem linfóide ou mielóide, que recebem a denominação de blastos leucêmicos, os quais estão em quantidades superiores a 25% no sangue periférico na maioria das vezes. A figura 1 apresenta uma foto mostrando a presença de blastos leucêmicos em uma amostra de sangue periférico. Esses blastos são incapazes de se diferenciar em células maduras, devido a um bloqueio de maturação, o que consiste no marco fisiopatológico das leucemias agudas (WANG, 2000; BENE et al., 2001). Em geral, os pacientes com leucemias agudas têm pior prognóstico e, se não forem tratados adequadamente, podem vir a óbito em dias ou semanas (PEJOVIC, 2002; BAIN, 2003).

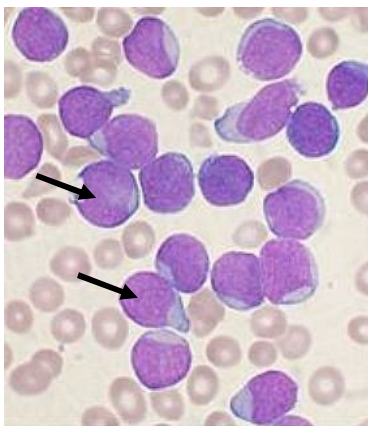


Figura 1. Presença de blastos leucêmicos no sangue periférico.

Fonte: Disponível em <<http://www.jornallivre.com.br/156418/o-que-e-leucemia-linfoide-aguda.html>> Acesso em 16 de julho de 2009.

A LLA é uma doença heterogênea, que varia de acordo com a linhagem celular dos linfoblastos leucêmicos, com os diferentes graus de diferenciação e com as alterações genéticas moleculares, representando mais de 90% das anormalidades cromossômicas encontradas (LOPES, 2000).

A LLA ocorre em adultos e crianças, sendo responsável por cerca de 80% dos casos de leucemia aguda na infância (LAKS *et al.*, 2003) e 50% de todas as malignidades hematopoiéticas (DOWNING & SHANNON, 2002). Segundo a revisão realizada por Plasschaert e colaboradores (2004), a incidência no mundo em crianças de até cinco anos é de 5,7 por 100.000 pessoas por ano, e em adultos é de 0,4 por 100.000 pessoas aos 40 anos, aumentando para 0,8 acima dos 75 anos de idade. Em adultos a LLA é uma leucemia relativamente rara, contabilizando 2% a 3 % das malignidades hematopoiéticas (DOWNING & SHANNON, 2002).

O prognóstico, em crianças, é o mais favorável de todos os cânceres, com mais de 95% de remissão completa e taxas de sobrevida, sem a doença, de 63% a 83% (SCHRAPPE *et al.*, 2000). Pui & Evans (1998), citam que a taxa de cura na infância, com quimioterapia intensiva, é de 70% a 80%. Adultos com LLA apresentam prognóstico pior, com remissão completa de 75% a 89% e taxa de sobrevida em longo prazo, sem a doença, de 28% a 39% (GOKBUGET & HOELZER, 2002). Os progressos no tratamento de pacientes com LLA levaram a melhora das taxas de sobrevida, sendo as crianças as mais beneficiadas. A taxa de cura nos adultos, com quimioterapia, é de apenas 25% a 40%, por causa do alto risco de reincidência (POPAT *et al.*, 2003).

Em geral, os protocolos de tratamento são comparáveis entre si. Iniciam com terapia de indução, usando múltiplos quimioterápicos, seguido das fases de consolidação e manutenção. Os quimioterápicos utilizados incluem vincristina, dexametasona, daunorrubicina, doxorrubicina, metotrexato e mercaptopurina. A profilaxia do sistema nervoso central é necessária para aumentar as taxas de sobrevida e evitar infiltração no cérebro (PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

Para crianças, o tratamento profilático consiste em metotrexato intratecal para os casos de baixo risco, com adicional metotrexato intravenoso para os grupos de alto risco (PUI & EVANS, 1998). Em adultos, há poucas terapias direcionadas à profilaxia do SNC, e a prioridade é obter uma remissão completa e duradoura da medula óssea, além da prevenção da infiltração no SNC. Os resultados mais

favoráveis são obtidos com altas doses de quimioterapia, combinada com terapia intratecal e irradiação do SNC. A maioria dos regimes de tratamento em adultos para LLA já inclui altas doses de quimioterapia para reduzir os riscos de reincidência (BENNETT *et al.*, 1981).

Um dos protocolos de maior notoriedade internacional é o desenvolvido pelo grupo alemão Berlim-Frankfurt-Munique (BFM), (VIANA *et al.*, 1994; SACKMANN-MURIEL *et al.*, 1999). Esse protocolo utiliza a estratificação dos pacientes conforme os grupos de risco para ocorrência de reincidência. Os pacientes com maior risco são tratados com quimioterapia intensiva.

O tratamento inclui quatro fases: indução de remissão, consolidação, manutenção e profilaxia do SNC. O principal objetivo do tratamento é induzir a remissão completa, ou seja, atingir menos de 5% de blastos na medula óssea e restaurar a hematopoiese normal. Logo após, é iniciada a fase de consolidação, cujo objetivo é reduzir a doença residual mínima (presença de células leucêmicas na medula óssea indetectáveis à microscopia ótica, entretanto detectáveis por citometria de fluxo) e ajustar a intensidade do tratamento, conforme a estratificação do risco de reincidência (LAKS *et al.*, 2003).

O protocolo BFM utiliza a chamada terapia de reindução durante a fase de consolidação, que consiste na utilização dos mesmos fármacos administrados durante a fase de indução. Posteriormente é realizada a terapia de manutenção, cujo objetivo é a erradicação de células leucêmicas residuais. Nesta fase, a quimioterapia é menos intensiva. A profilaxia do SNC é iniciada durante a fase de indução, e inclui radioterapia e quimioterapia (LAKS *et al.*, 2003).

A maioria das crianças e alguns adultos com LLA podem ser curados com quimioterapia intensiva. Para aqueles pacientes que sofrem recaídas ou não conseguem remissão completa, o transplante de células-tronco hematopoiéticas oferece melhores possibilidades de controle da doença, em longo prazo. O risco da relação transplante/mortalidade precisa ser balanceado com o potencial de cura apenas pela quimioterapia convencional. O transplante de células-tronco, após a terapia de indução, é recomendável em pacientes que têm um alto risco de recaída após a quimioterapia (POPAT *et al.*, 2003).

1.1.3 Melanoma

O câncer de pele atualmente é a forma mais comum e de fácil prevenção, no entanto, a incidência está atingindo proporções epidêmicas, representando hoje cerca de um terço de todas as formas de câncer diagnosticadas. É dividido em não melanoma (carcinoma basocelular ou carcinoma epidermóide) e melanoma.

O carcinoma basocelular se origina da epiderme e dos apêndices cutâneos localizados acima da camada basal, como pêlos (Figura 2 – A). Já o carcinoma epidermóide tem origem no queratinócito da epiderme, mas também pode surgir no epitélio escamoso das mucosas (Figura 2 – B). O carcinoma basocelular é diagnosticado através de uma lesão com evolução lenta, ao passo que o carcinoma epidermóide surge por meio de uma ferida, que evolui rapidamente, e vem acompanhada de secreção e de prurido. Neste, a maior gravidade está relacionada à ocorrência de metástases, embora raramente sejam letais. Nesses casos, a cirurgia é o tratamento mais indicado. O tratamento cirúrgico geralmente é curativo, apesar de ser muito dolorido e, às vezes, até desfigurante. Porém, dependendo da extensão, o carcinoma basocelular pode ser tratado também através de medicamento tópico ou radioterapia (WHO, 2007).



Figura 2. A - Carcinoma basocelular e B – Carcinoma epidermóide.

Fonte: WHO - World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html. Acesso em 18 de novembro de 2007.

Atualmente o câncer de pele não melanoma é o que apresenta maior incidência no país, correspondendo a aproximadamente 1 em cada 5 novos casos de câncer. Entretanto, por apresentar altos índices de cura, este tipo de câncer tem uma das mais baixas taxas de mortalidade. O câncer de pele não melanoma pode causar uma destruição do tecido local e deformação se não for tratado, também pode carrear um risco de metástase, entretanto está associado a uma menor morbidade e mortalidade quando comparado a outros tumores malignos (CHAKRABARTY, 2004).

O melanoma (Figura 3) é um câncer relativamente raro que ocorre principalmente em pessoas jovens. No entanto, nos últimos 30 anos observou-se aumento da incidência e da mortalidade em várias regiões do mundo (BOYLE *et al.*, 1995). Estudos apontam um aumento de 2,4% e 1,8% na incidência mundial de melanoma em homens e mulheres respectivamente entre os anos de 1992 e 2001 (FROM *et al.*, 2007). Alguns estudos revelaram correlação inversa entre as taxas de incidência de melanoma e latitude (BULLIARD *et al.*, 1994). Porém este padrão de aumento da incidência entre populações mais próximas ao Equador não é consistente. A análise das taxas de mortalidade mostrou correlação positiva com a latitude, sugerindo que outros fatores, tais como pigmento da pele, possam ser mais importantes do que o gradiente de latitude na ocorrência do melanoma (WÜNSCH FILHO & MONCAU, 2002). As regiões Sul e Sudeste do Brasil, embora com menor exposição aos raios solares, têm maiores proporções de descendentes europeus e, conseqüentemente, estas parcelas da população estão menos protegidas. No Norte e Nordeste do Brasil, embora a exposição às radiações solares seja mais intensa, a população como um todo está mais protegida dos raios solares, pois conta com maiores proporções de descendentes indígenas e africanos (WÜNSCH FILHO & MONCAU, 2002).

A principal causa de morte de pessoas acometidas por doenças de pele está intimamente relacionada ao melanoma, que é uma neoplasia maligna (Figura 3). No mundo inteiro a incidência do melanoma vem aumentando de 3% a 7% anualmente (LENS & DAWES, 2004; LUI *et al.*, 2007). Em estágio avançado é letal, pois atualmente há poucos tratamentos eficazes que resultem em melhora efetiva do paciente vítima dessa moléstia.



Figura 3. Melanoma maligno.

Fonte: WHO - World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html. Acesso em 18 de novembro de 2007.

Não só a incidência como também a morbidade e mortalidade do melanoma vêm aumentando. A metástase ocorre em certos órgãos mais do que em outros dependendo da origem do tumor primário. Os sítios mais freqüentes de disseminação metastática do melanoma são a pele, o subcutâneo e os linfonodos (42-59%). Em segundo lugar como principal víscera acometida está o pulmão (18-36%) (MEYERS & BALCH, 1998). Sua forma metastática é, na maioria das vezes, incurável, com taxas de sobrevida em 5 anos menores que 5% e de sobrevida mediana em torno de 4 meses (LEE *et al.*, 2000; JEMAL *et al.*, 2004).

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do melanoma é o número de nevos melanocíticos na pele, enquanto que o segundo fator de risco mais importante é a presença de nevos melanocíticos atípicos. Alguns aspectos destas lesões, como: bordas não-definidas, bordas irregulares, lesão com coloração variada, diâmetro igual ou superior a 5 mm e a presença do componente macular aumentam o risco de desenvolvimento do melanoma (WAGNER *et al.*, 2000).

Os nevos melanocíticos desenvolvem-se principalmente durante a infância e a adolescência, sendo que a quantidade desses nevos aumenta com o avanço da idade. O desenvolvimento dos nevos melanocíticos, na infância, deve-se principalmente à exposição solar, o tipo de pele e a reação após a exposição solar além da herança genética (GARBE & EIGENTLER, 2007).

Um significativo progresso no diagnóstico precoce do melanoma cutâneo ocorreu com o desenvolvimento da dermoscopia, ou seja, a microscopia de superfície. É um método utilizado para auxiliar o exame de lesões de pele a olho nu, que aumenta a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico clínico do melanoma cutâneo, de 60% para mais de 90%. Não necessita de biópsia para confirmação, apesar de que o exame histopatológico do tumor primário é o procedimento inicial mais utilizado para estimar a existência de doença metastática, mesmo não havendo atualmente marcador molecular que possa prever com precisão o potencial metastático para o melanoma. O auto-exame periódico da pele e a detecção da doença na fase inicial otimizam o prognóstico e reduzem significativamente a mortalidade por melanoma cutâneo (RHODES, 2006).

A metástase é a principal causa de mortalidade por melanoma. Metástase é a migração de células cancerosas para um local ou parte do corpo distante do tumor primário. A formação da metástase é um processo complexo: células tumorais destacam-se do tumor primário, invadem o tecido circunjacente e as membranas basais, intravasam para circulação linfática ou sanguínea, e, finalmente, aderem e extravasam para órgãos distantes (HOLZMANN *et al.*, 1998).

A cura do melanoma está diretamente relacionada ao diagnóstico e ao tratamento no início do seu desenvolvimento. Estudos sobre a biologia molecular do melanoma buscam a identificação de marcadores moleculares importantes na previsão do diagnóstico e na melhoria do prognóstico dos indivíduos com essa doença (WALDMANN *et al.*, 1999; PROJETO DIRETRIZES, 2002).

As opções terapêuticas atuais incluem a excisão cirúrgica, terapia fotodinâmica, quimioterapia, imunoterapia e a associação das duas (bioquimioterapia) e a radioterapia, sem apresentar grande impacto na sobrevida global, além disso, a cirurgia raramente tem potencial curativo e a radioterapia é apenas paliativa. Apenas 10% a 20% dos pacientes em tratamento com quimioterapia têm resposta satisfatória em geral de curta duração (EWEND *et al.*, 1996; SOMASUNDAR *et al.*, 2005).

A terapia fotodinâmica utiliza a interação de um agente fotossensibilizador, como porfirinas ou ftalocianinas, luz com comprimento de onda adequado e oxigênio molecular, levando a produção de agentes letais que inativam as células tumorais. Um desses agentes é o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), responsável

pela atividade fotobiológica (BONNETT, 1995; KOLAROVA *et al.*, 2007). A terapia fotodinâmica atua em carcinomas de pele e outros tipos de câncer, porém em melanoma metastático sua ação é pouco efetiva. Neste último caso a quimioterapia, bioquimioterapia, radioterapia, adjuvantes imunes, vacinas, citocinas e combinações imuno-estimulantes específicas também são usados, mas a resposta desses tratamentos ainda é insatisfatória (TARHINI & AGARWALA, 2005; KASPER *et al.*, 2007). Novas estratégias terapêuticas baseadas no âmbito molecular estão sendo desenvolvidas, utilizando fármacos anti-angiogênicos e imunomoduladores, terapia antisenso Bcl-2, moduladores de proteínas de choque térmico, inibição citotóxica do linfócito T associado à proteína 4 (CTLA-4), anticorpos monoclonais (MABs), inibição da poly(ADP-ribose) polimerase (PARP) e inibidores de proteossoma (RIVOLTINI *et al.*, 2003; PIRO, 2004; RIBAS *et al.*, 2005; TENTORI *et al.*, 2005; MARKOVIC, 2005).

Atualmente não há agente terapêutico conhecido no mercado que proporcione um prolongamento da vida dos pacientes com melanoma metastático. Os protocolos de tratamento quimioterápico no melanoma metastático incluem dacarbazina, temozolomida, nitrosurêias (carmustina, lomustina, fotemustina), análogos da platina (cisplatina, carboplatina), as vincas (vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel) (EWEND *et al.*, 1996).

A dacarbazina é considerada o agente mais ativo e melhor estudado em monoterapia, com respostas que variam entre 7% a 20% (SERRONE *et al.*, 2000; AVRIL *et al.*, 2004). A temozolomida, um análogo da dacarbazina, é convertido ao metabólito ativo (5-(3-metil-1H-imidazol-4-carboxamida), que facilita o efeito do quimioterápico no SNC (AGARWALA *et al.*, 1998; MIDDLETON *et al.*, 2000).

Recentemente, a combinação de temozolomida com talidomida mostrou respostas encorajadoras, tanto no SNC como sistêmica (HWU *et al.*, 2003; MEHTA *et al.*, 2003). A fotemustina é uma cloroetilnitrosurêia lipossolúvel com alta penetração no SNC, no entanto, este fármaco apresenta uma elevada mielotoxicidade, trombocitopenia e neutropenia (MEHTA *et al.*, 2003). Independente do agente quimioterápico, a duração de resposta em geral varia apenas de 4 a 6 meses. Outros compostos mais novos, como os taxanos, não apresentam atividade satisfatória (SEEGENSCHMIEDT, KEILHOZ, ALTENDORF-HOFMANN, 1999).

A poliquimioterapia (combinação de 2 a 4 fármacos) geralmente resulta em aumento da resposta, que varia entre 30% a 50%. As combinações são freqüentemente baseadas na dacarbazina associada à cisplatina, vinblastina e/ou carmustina ou fotemustina. Todavia, vários estudos não conseguiram demonstrar vantagens definitivamente convincente da terapia combinada em relação a monoterapia (DELPRETE, MAURER, O'DONNEL, 1984; CHAKRABARTY & GEISSE, 2004).

A imunoterapia também representa uma alternativa de tratamento. Recentemente vários trabalhos mostram que agentes sintéticos que modificam a resposta imune, bem como os próprios agentes imunológicos, testados em pacientes com melanoma, apresentaram uma resposta de 15% a 20% melhor do que a quimioterapia (CHAKRABARTY & GEISSE, 2004; RIKER *et al.*, 2005).

Protocolos associando a quimioterapia e a imunoterapia, de forma seqüencial ou concomitante, registraram resposta objetiva superiores ao observado quando estas modalidades são utilizadas isoladamente, situando-se em patamares acima de 50%, em relação à monoterapia, no entanto, sem aumento significativo do tempo médio de vida do paciente (LEGHA, RING, ETON, 1998).

O papel da radioterapia no tratamento do melanoma é limitado e tem relação direta com a dose empregada e com a extensão e localização do tumor. Sua maior indicação é para o tratamento paliativo de metástases sintomáticas em ossos, cérebro (ANG *et al.*, 1998. SEHN *et al.*, 2000).

Considerando as diversas opções de tratamento para o melanoma maligno, a resposta terapêutica ainda permanece indefinida, sendo assim, o entendimento dos mecanismos moleculares de morte das células de melanoma e a investigação de novos alvos farmacológicos se faz necessário. Trabalhos recentes mostram que o principal problema associado ao tratamento não responsivo do melanoma é o desenvolvimento de mecanismos de resistência ao tratamento.

Alternativas promissoras no tratamento antitumoral pode ser a descoberta de novas terapias que promovam a manipulação da via apoptótica como tentativa de impedir desenvolvimento de metástases, desequilíbrio do balanço antioxidante principalmente através da depleção da GSH e/ou através da geração de espécies reativas, depleção do potencial energético, além da inibição das moléculas

de adesão o que impede o desenvolvimento de metástases. Assim, o entendimento da sinalização intracelular, que conduz a apoptose, é de fundamental importância para o esclarecimento dos possíveis alvos para intervenção terapêutica e para elucidação dos mecanismos de resistência aos fármacos.

Estudos *in vitro* e *in vivo* são de fundamental importância para o melhor entendimento do comportamento biológico dessa neoplasia e para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. A cultura de células e a utilização de animais de experimentação são modelos experimentais vantajosos para testar um grande número de fármacos e selecionar compostos específicos com ação sobre este tipo de tumor (KREUTZ, 1992).

Existem diversos modelos experimentais de melanoma, os quais envolvem diversas linhagens celulares e distintos animais de experimentação, apresentando desfechos biológicos variados.

A linhagem celular selecionada para o presente trabalho foi a variante F10 do melanoma murino B16. O cultivo desta linhagem celular em laboratório apresenta rápido crescimento e é facilmente transplantada *in vivo*, com alta capacidade de disseminação metastática.

1.2 APOPTOSE - IMPORTANTE ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e envelhecimento (DEGTEREV & YUAN, 2008; LOOS & ENGELBRECHT, 2009). Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese (RICCI & ZONG, 2006).

A necrose caracteriza-se pela perda da integridade da membrana plasmática (permeabilidade), levando a liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular estimulando a resposta inflamatória e ampliando a lesão tecidual (PATEL, 2000; PAROLIN, 2001). Os restos celulares permanecem por longos períodos antes de serem removidos pelas células inflamatórias, o que pode causar injúria e até morte de células vizinhas. Nestas condições um grande número de células é afetado e, devido ao desencadeamento do processo inflamatório, ocorrem alterações irreversíveis nos tecidos ou órgãos (CURTIN *et al.*, 2002).

Durante o processo de necrose também ocorrem alterações da função mitocondrial com depleção completa dos níveis de ATP, o que interfere na função da bomba de Na^+ e K^+ e consequentemente resulta na tumefação celular, devido ao aumento de Na^+ citosólico. Da mesma maneira, ocorre um desequilíbrio no metabolismo do Ca^{2+} , pois as bombas de efluxo de cálcio também necessitam de ATP. A concentração de Ca^{2+} citoplasmático aumenta o que resulta na ativação de fosfolipases e proteases com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs por sua vez, induzem a ruptura da membrana plasmática, a ativação de proteases, o extravasamento do conteúdo celular e a sinalização para migração de macrófagos, ativando a resposta inflamatória (McCONKEY, 1998).

Assim como a necrose, a mitose catastrófica é um processo passivo; porém, alguns estudos sugerem que ela também pode apresentar uma regulação genética (CASTEDO *et al.*, 2004). A mitose catastrófica envolve uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea. Geralmente, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a morte (WEAVER & CLEVELAND, 2005).

A senescência é um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais. As células que entram em senescência perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares (LUM *et al.*, 2005; DIMRI, 2005).

Estudos têm mostrado que a morte celular programada nem sempre precisa ocorrer pelo modo apoptótico clássico, e que a expressão molecular e morfológica de morte celular depende de quais caminhos específicos são engajados ou inibidos (BASS *et al.*, 2009). Lee e Baehrecke (2001) realizaram um importante estudo sobre morte celular programada em *Drosophila*. Baseados em uma ampla revisão na literatura, tais autores definiram três tipos de morte celular programada. O primeiro tipo, a apoptose é encontrada em células que morrem isoladamente e que exibem condensação do núcleo e citoplasma, seguida por fragmentação e fagocitose por células que degradam o conteúdo celular. O segundo tipo, conhecido como autofagia, é observado quando grupos de células ou tecidos inteiros são destruídos. Estas células contêm vacúolos autofágicos no citoplasma que funcionam na degradação dos componentes celulares (BASS *et al.*, 2009). O terceiro tipo foi denominado morte não lisossômica, é a menos comum e é caracterizada por inchamento de cavidades com bordas membranosas seguidas por degeneração sem atividade lisossômica (LEE & BAEHRECKE, 2001).

Autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Ela ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares, sem ocorrer à fragmentação do DNA, típico do processo apoptótico (DEGTEREV & YUAN, 2008; BASS *et al.*, 2009). Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos. Estes irão se fundir com os lisossomos, e posteriormente, o conteúdo dos autofagossomos será degradado pelas hidrolases lisossomais (OKADA & MAK, 2004).

A relevância fisiológica da autofagia na progressão e formação do tumor ainda é controversa, parece que ela desempenha um importante papel no prolongamento da vida das células tumorais que estão frequentemente expostas a um estresse metabólico, no entanto uma função supressora do tumor também tem sido sugerida (BASS *et al.*, 2009). Embora a autofagia possa ser uma importante

estratégia terapêutica no tratamento do câncer, ainda é necessário aprimorar as técnicas de identificação e clarear a relevância patofisiológica deste processo (TING, *et al.*, 2008).

A apoptose, fenômeno de morte celular programada (Figura 4), que ocorre individualmente, pois a morte de uma célula não leva à morte de outras células, é considerada a forma fisiológica de morte celular. Fenômeno que se caracteriza pela remoção de células lesadas, senescentes ou não funcionais, sem alteração do microambiente celular (KERR, 1972; PATEL, 2000; TING *et al.*, 2008).

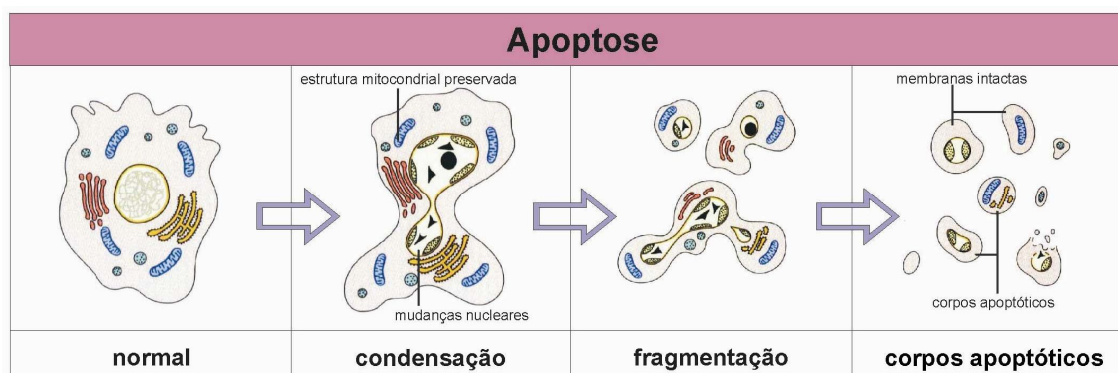


Figura 4. Mecanismos de morte celular: apoptose.

Fonte: Adaptado do Catálogo BioAgency 2004-05, Cap. 9 - Apoptose e Inflamação. Disponível em: <http://www.bioagency.com.br/informacao/default.asp>. Acesso em 22 de dezembro de 2006.

Além da sua função fisiológica a apoptose desempenha importante papel nas doenças autoimunes, hepatites, carcinogênese, lesões por álcool e drogas de abuso e fármacos, rejeição de transplantes e no tratamento quimioterápico (KERR, 1972; PATEL, 2000).

A apoptose é definida como um processo ativo, cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido a ativação de proteases endógenas (PATEL, 2000). A ativação das proteases compromete a integridade do citoesqueleto celular, em resposta ocorre uma contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas alterando o posicionamento dos seus lipídeos constituintes, isto é a fosfatidilserina que habitualmente encontra-se no lado interno da membrana expõe-se para o lado externo, atuando como um sinalizador para o processo de fagocitose (WYLLIE, 1985; COMPTON, 1992; PAROLIN, 2001).

No processo de apoptose ocorrem alterações características no núcleo celular devido à ativação de endonucleases que degradam o DNA, desta forma o

núcleo torna-se picnótico a cromatina condensa-se, o núcleo entra em colapso e fragmenta-se. As bolhas formadas no citoplasma celular separam-se em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas, resultando na formação dos corpos apoptóticos, os quais são fagocitados pelos macrófagos teciduais e células adjacentes (THOMPSON, 1998; EDINGER & THOMPSON, 2004).

O processo de apoptose pode ser deflagrado por estímulos externos por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular caracterizando a via extrínseca ou via receptor de morte celular, ou pelo estresse intracelular caracterizando a via intrínseca ou mitocondrial (Figura 5) (EDINGER & THOMPSON, 2004).

A apoptose iniciada pela via extrínseca requer a ativação de receptores de morte presentes na membrana citoplasmática, tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo1 e TNF-R1, o qual pertence a superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (TNF). A apoptose iniciada por esta via culmina na ativação da pró-caspase 8.

Todos os receptores de morte identificados como pertencentes à superfamília do TNF localizam-se na membrana citoplasmática e apresentam em comum um domínio extracelular rico em cisteína e uma região intracelular altamente conservada contendo aproximadamente 80 aminoácidos conhecido como domínio de morte essencial para iniciar a apoptose pela via extrínseca (ÖZÖREN & EL-DEIRY, 2003).

Quando o ligante-Fas acopla-se ao receptor Fas, as moléculas individuais do receptor se trimerizam agregando as cadeias protéicas da morte o que permite a ligação a uma proteína citoplasmática chamada de cadeia de morte associada ao Fas (FADD). O FADD tem dois domínios distintos, um capaz de interagir com o domínio de morte presente no Fas (DD) e outro capaz de ligar-se a pró-caspase 8, conhecido como domínio efetor da morte (DED). O DED presente no FADD é essencial para sinalização da apoptose (ÖZÖREN & EL-DEIRY, 2003).

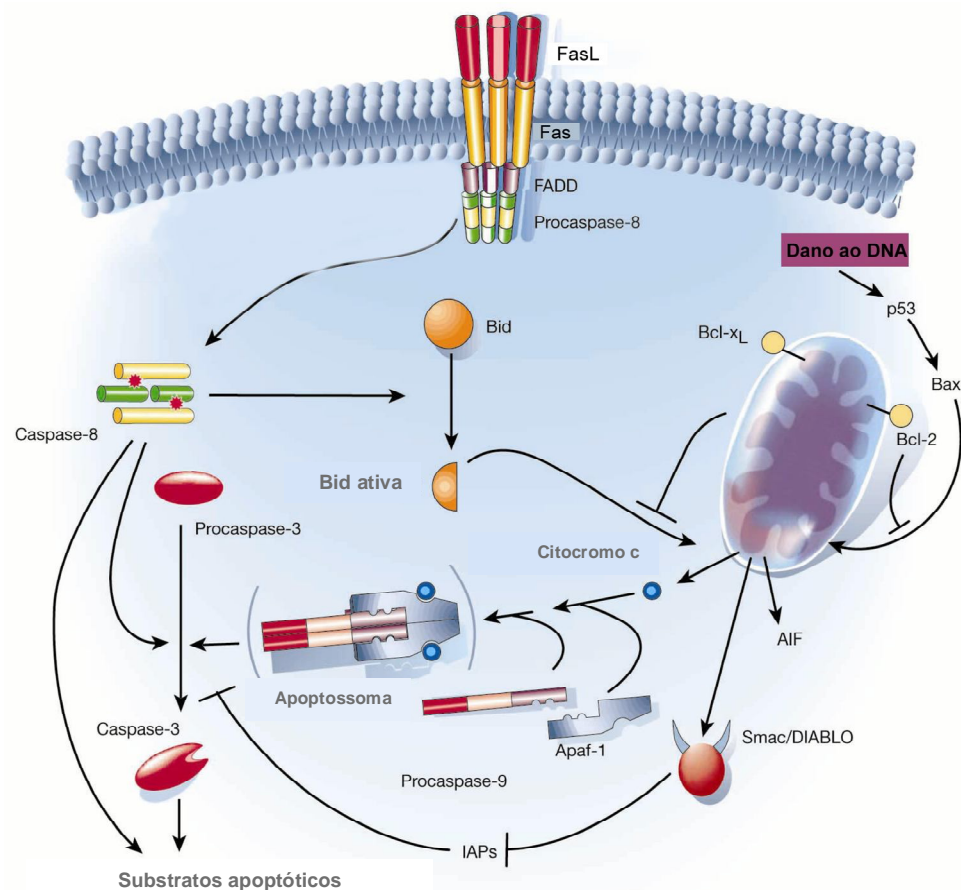


Figura 5. As duas principais vias apoptóticas. Na via mitocondrial o estresse celular induz a translocação de membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos do citosol para a mitocôndria, onde induzem a saída do citocromo c. O citocromo c no citosol promove a ativação do Apaf-1 e da pró-caspase 9, formando o apoptossoma, o qual ativa a pró-caspase 3, induzindo à apoptose. O citocromo c e o Smac/DIABLO são liberados da mitocôndria após estímulos apoptóticos. Enquanto o citocromo c ativa o Apaf-1, o Smac/DIABLO inibe a ligação das caspases às IAPs (Proteínas Inibidoras da Apoptose). A segunda via é dependente do receptor. A ativação da pró-caspase 8 pela ligação ao receptor de morte está ilustrada. O Fas-ligante (FasL) associa-se a FADD na região intracelular. Este complexo ativa a pró-caspase 8. A caspase-8 ativada pode ativar diretamente a procaspase-3 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid, a qual subsequente induz a saída do citocromo c.

Fonte: Adaptado de HENGARTNER, 2000.

A ligação da pró-caspase 8 a este complexo, conhecido como complexo de indução da sinalização da morte (DISC), resulta na sua ativação por clivagem proteolítica (PAROLIN & REASON, 2001; GHOBRIAL *et al.*, 2005). A caspase 8, uma vez ativada, dá início a uma cascata de clivagens ativando diretamente a caspase 3, conhecida como caspase efetora, resultando em apoptose. A caspase 8 ativada pode também promover a clivagem de uma proteína citoplasmática pró-apoptótica, conhecida como BID, que migra para a mitocôndria levando a liberação

do citocromo *c*, dando início a apoptose pela via mitocondrial ou via intrínseca (ÖZÖREN & EL-DEIRY, 2003).

Além dos receptores de morte, a apoptose pode também ser deflagrada por sinais de estresse intracelular que resultam em disfunção mitocondrial. O mecanismo característico da via mitocondrial ou intrínseca da apoptose é a translocação de proteínas pró-apoptóticas do citoplasma celular para a mitocôndria, que resulta na alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e consequentemente na liberação do citocromo *c* presente no espaço existente entre a membrana externa e a interna.

O citocromo *c* quando liberado da mitocôndria associa-se a duas proteínas presentes no citoplasma celular, o fator ativador da apoptose 1 (Apaf-1) e a pró-caspase 9 para formar o apoptossoma, que na presença de ATP ativa caspase 9 que por sua vez ativa as caspases 3 e 7 que executam o processo de apoptose (PAROLIN & REASON, 2001; BRAS *et al.*, 2005).

A caspase 3 por sua vez pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase 8 e pela clivagem da proteína anti-apoptótica *Bcl-2* que, normalmente, garante a integridade da membrana mitocondrial (PHILCHENKOV, 2004), mantendo o poro de transição de permeabilidade mitocondrial fechado, assegurando a sobrevivência celular. Diferentes estímulos podem culminar na abertura do poro de permeabilidade mitocondrial, resultando na morte celular pela ativação das caspases (DEGTEREV & YUAN, 2008).

A família *Bcl-2* é a chave tanto na regulação da apoptose quanto na resistência ao tratamento quimioterápico. A família *Bcl-2* inclui membros pró-apoptóticos tais como, Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim e Hrk e moléculas anti-apoptóticas como *Bcl-2*, Bcl-Cl, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1 (GHOBRIAL, *et al.*, 2005). As moléculas anti-apoptóticas bloqueiam a apoptose impedindo a liberação do citocromo *c* enquanto, as pró-apoptóticas são promotoras da apoptose. Estes efeitos são dependentes de um estreito equilíbrio entre a ativação e a síntese de *Bcl-2* anti e pró-apoptóticas, pois os membros desta família estão intimamente envolvidos na regulação do processo apoptótico.

Diversos estudos sugerem diferentes mecanismos de ação da família *Bcl-2* (REED, 1999; ANTONSSON & MARTINOU, 2000), os quais são: formação de um

poro na membrana mitocondrial que permite a liberação do citocromo *c* e de outras proteínas presentes no espaço intermembranas, ativando assim o processo de apoptose; regulação direta da via das caspases; regulação dos canais iônicos; modulação da homeostasia mitocondrial.

Entre as proteínas *Bcl-2* que podem ser ativadas iniciando o processo apoptótico encontra-se a proteína pró-apoptótica BID. Esta proteína está presente no citoplasma celular na forma inativa. A ativação da BID é induzida pela ativação da caspase 8 pelo Fas em que a proteína é clivada por esta caspase e transloca-se para a membrana mitocondrial e liga-se a Bax. A Bax é outra proteína pró-apoptótica. Este complexo protéico forma um poro na membrana mitocondrial que promove a liberação do citocromo *c* e outras proteínas anti e pró-apoptóticas como o SMAC Diablo e o AIF (fator indutor da apoptose). O SMAC Diablo atua inibindo as proteínas inibidoras da apoptose presentes no citoplasma celular. Desta forma quando ocorre a liberação do citocromo *c* e conseqüente formação do apoptossoma a caspase 3 é ativada efetuando o processo apoptótico (GOTTLIEB, 2000; CORY & ADAMS, 2002).

A Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 antiapoptótica (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax), desta forma quando a Bax forma heterodímeros com a Bcl-2 a morte celular é suprimida, por outro lado, quando ocorre a formação do homodímero Bax/Bax a apoptose é promovida (GOTTLIEB, 2000; VERMEULEN *et al.*, 2003).

No entanto, como discutido anteriormente, as proteínas da família *Bcl-2* também apresentam uma importante função anti-apoptótica, que é regulada por multi-sítios de fosforilação envolvendo interações entre várias proteínas da família. Níveis elevados de proteínas desta família (Bcl-2 e Bcl-X) bloqueiam a apoptose (VERMEULEN *et al.*, 2003). A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa das células e dentre suas atuações está o bloqueio da liberação do citocromo *c* pela mitocôndria, após o estímulo apoptogênico, por impedir a formação de poros na membrana mitocondrial. Esta ação impede, portanto, a ativação das caspases (COULTAS & STRASSER, 2003).

A via Bcl2 é controlada por proteínas pró e anti apoptóticas, como já mencionado, e por diversas proteínas citoplasmáticas, entre elas encontram-se as IAPs (proteínas inibidoras da apoptose). Das proteínas citoplasmáticas com

atividade anti-apoptótica pode-se destacar a XIAP que atua inibindo a ativação das caspases e a cFLIP, que age inibindo a ativação do domínio de morte do receptor de morte Fas (PHICHENKOV, 2004; SHIOZAKI & SHI, 2004).

A XIAP liga-se ao sítio ativo das caspases efetoras 3 e 7 prevenindo a ligação da caspase com seu substrato. Por outro lado, a XIAP também pode ser inibida pela proteína SMAC/Diablo, quando isso ocorre a cascata das caspases é efetivada e consequentemente o processo apoptótico (SHIOZAKI & SHI, 2004). O cFLIP, por sua vez, apresenta estrutura semelhante a pró-caspase 8 ligando-se assim ao DED do FADD impedindo a formação do DISC e consequentemente a ativação das caspase 8 e 3 (COULTAS & STRASSER, 2003; PHICHENKOV, 2004). Neste sentido ressalta-se a importância da descoberta de novos compostos capazes de regular o processo apoptótico nas estratégias de tratamento quimioterápico.

1.3 POTENCIAL ENERGÉTICO E REDOX

As mitocôndrias têm um papel central no metabolismo energético. Geram 80% a 90% do ATP necessário para respiração e sobrevivência celular por fosforilação oxidativa, regulam o fluxo de cálcio e têm um importante papel na integração de estímulos pró e anti-apoptóticos, conforme descrito anteriormente (DIAS & BAILLY, 2005).

Falhas ou danos mitocondriais podem levar rapidamente à inibição da sobrevivência e da proliferação celular. Fármacos que comprometem a integridade estrutural e funcional da mitocôndria podem prover novas oportunidades para combater a proliferação de células neoplásicas. Locais específicos na mitocôndria podem ser alvos moleculares, tais como: a cadeia respiratória, o DNA mitocondrial, os canais de potássio, a família de proteínas Bcl-2 e os poros de transição da permeabilidade (DIAS & BAILLY, 2005).

Como a mitocôndria é o principal local a consumir oxigênio na célula, torna-se o sítio principal de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LASH, 2006). O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante para causar uma série de mudanças fisiológicas que caracterizam o estresse oxidativo, o qual pode culminar em morte celular (McCONKEY, 1998; ALLEN & TRESINI, 2000).

Enquanto um elevado ou moderado nível de estresse oxidativo é potencialmente citotóxico e bloqueia a proliferação, por induzir células à apoptose e até à necrose, um baixo nível de estresse pode estimular a divisão celular e o crescimento tumoral (DREHER & JUNOD, 1996).

O estímulo carcinogênico pode estar relacionado ao desequilíbrio redox intracelular, como consequência do acúmulo de espécies reativas que ocorrem devido a injúrias endógenas e exógenas (VALKO *et al.*, 2006). Não obstante, a persistência do estresse oxidativo em células tumorais pode ativar protooncogenes e fatores de transcrição; levar a uma instabilidade genômica e a uma resistência à quimioterapia e à radioterapia; provocar invasão celular e metástase (NAVARRO *et al.*, 1999).

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação de EROs, oriundas da presença e da utilização do oxigênio nas células e nos tecidos, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas destacam-se as enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e o conjunto das glutathione S-transferases (GSTs) (Figura 6). As glutathione S-transferases, embora não atuem diretamente contra os radicais livres, são importantes na defesa celular, pois estão associadas a biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação da glutathione na forma reduzida (GSH) com estes compostos, aumentando a solubilidade e facilitando a excreção.

Uma das defesas antioxidantes intracelulares mais importantes é a GSH, um tripeptídeo, γ -glutamylcysteinylglycine, principal tiol não protéico, de baixo peso molecular, presente em todas as células aeróbicas. A GSH é sintetizada intracelularmente pela ação de duas enzimas citosólicas. A γ -glutamylcysteinylglycine synthetase (γ -GCS), que utiliza o glutamato (Glu) e cisteína (Cis) como substratos, forma o dipeptídeo γ -GluCis, que passa a ser combinado à glicina (Gli), numa reação catalisada pela glutathione synthetase (GSH synthetase), para gerar GSH. O ATP é um co-substrato para ambas as enzimas. Após sua síntese, a GSH é liberada para outros compartimentos intracelulares, incluindo mitocôndria, retículo endoplasmático e espaço extracelular para utilização por outras células e tecidos (BALLATORI *et al.*, 2005).

Após a exposição ao agente tóxico, a GSH é oxidada a GSSG, através da reação catalisada pela glutathione peroxidase (GPx). A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathione redutase (GR), na presença de NADPH, constituindo um ciclo redox essencial para manutenção da integridade do sistema protetor celular (Figura 6). Sob condições fisiológicas, a GR mantém mais de 98% da glutathione intracelular na forma reduzida (WANG & BALLATORI, 1998).

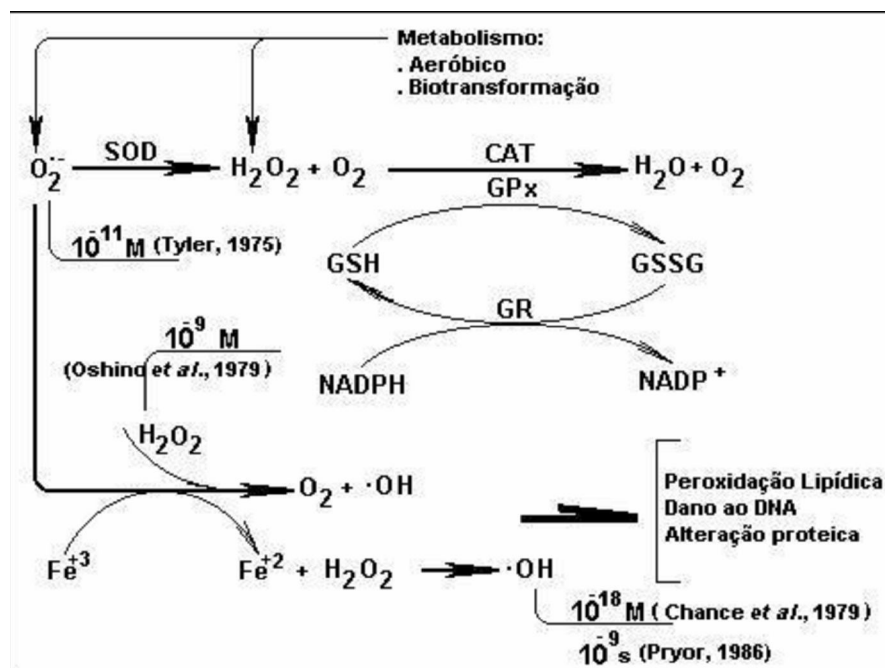


Figura 6. Defesas antioxidantes

Fonte: Adaptado de Chance *et al.*, 1979 e Pryor, 1986.

A perda de glutathiona citoplasmática é um evento característico de morte celular por apoptose, interferindo na capacidade redox da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes (SLATER *et al.*, 1995). Vários estudos relacionam a incidência de câncer com uma série de desordens nas funções enzimáticas, as quais estão ligadas à glutathiona (PASTORE *et al.*, 2003).

A glutathiona, além de estar envolvida na manutenção do balanço redox intracelular e das defesas contra o estresse oxidativo, está diretamente ligada com a capacidade metastática das células de melanoma (FRANK *et al.*, 2001; BENLLOCH *et al.*, 2005). Altas concentrações de glutathiona presentes nestas células podem suprimir a apoptose mediada pelos agentes antitumorais (UMANSKY *et al.*, 2000), pois o conteúdo intracelular de glutathiona está inversamente proporcional a capacidade do agente quimioterápico induzir a apoptose (CEN *et al.*, 2002).

Biroccio e colaboradores (2002), relataram que a apoptose é estimulada pela depleção de glutathiona. Neste contexto, estes autores demonstraram que o estímulo apoptogênico não está diretamente relacionado ao estresse oxidativo, mas que a inibição da extrusão de glutathiona da célula é importante para prevenir a

apoptose. Esses autores mostraram também que a liberação do citocromo *c*, pela mitocôndria, está relacionada com a depleção de glutathiona.

Adicionalmente, foi relatado que a depleção de glutathiona e a inibição da γ -glutamyl-cisteina sintase aumentam o efeito citotóxico de agentes quimioterápicos como a 1,3 bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea, cisplatina e mefalan (o que inibe a síntese de DNA ou o crescimento das linhagens de células de melanoma *in vitro*), bem como prolongam a sobrevivência de camundongos infectados com melanoma (CEN *et al.*, 2002).

O conteúdo intracelular de glutathiona é um parâmetro importante para a progressão de metástases, o que contribui muito para sobrevivência das células com alto poder metastático (ORTEGA *et al.*, 2003). Além disso, altas concentrações do tripeptídeo estão diretamente associadas com a capacidade dos tumores malignos em desenvolver o mecanismo de resistência a múltiplos fármacos (BENLLOCH *et al.*, 2005).

1.4 MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

O termo adesão celular descreve todas as formas de comunicação celular que ocorre devido ao contato direto entre as células ou entre as células e a matriz extracelular. A adesão seja entre uma célula e outra ou entre uma célula a matriz extracelular é fundamental para diversos processos biológicos (Figura 7), tais como desenvolvimento, diferenciação, transdução de sinais, resposta imunológica, manutenção da estrutura tecidual, metástases tumorais e cicatrização de ferimentos (WAGNER & WYSS, 1994).

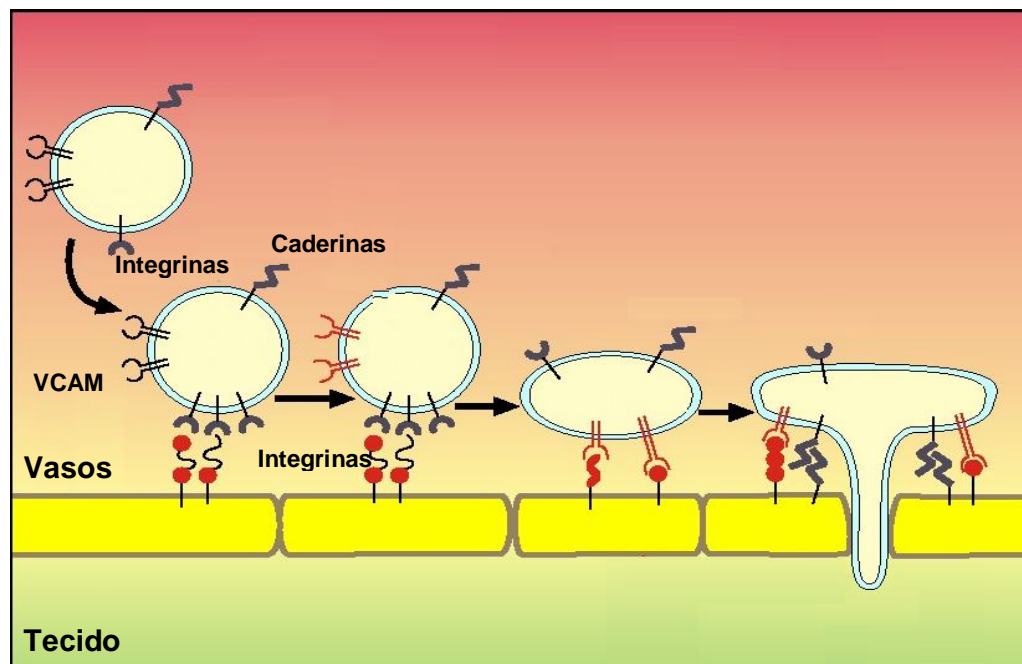


Figura 7. Moléculas de adesão celular.

Fonte: Disponível em: <www.sci.sdsu.edu/...Exam_keys/image5.jpg> Acesso em 13 de outubro de 2004.

O melanoma cutâneo é um dos tumores humanos mais analisados, em termos de expressão de moléculas de adesão celular (HART *et al.*, 1991; NESBIT & HERLIN, 1994). O grande número de estudos é justificado pelo fácil acesso às lesões melanocíticas e ao estudo histopatológico, o qual define os estágios do melanoma e a progressão tumoral (CLARK *et al.*, 1984; GUERRY *et al.*, 1993).

A progressão tumoral de muitos cânceres, incluindo melanoma maligno, com conseqüente formação de metástases, pode ser causada pela desorganização da atividade das moléculas de adesão (JOHNSON, 1996).

A base molecular da adesão celular foi identificada a mais de vinte anos, e nessa época também foram descritas as primeiras moléculas envolvidas no processo de adesão celular (WAGNER & WYSS, 1994). Duas classes distintas de moléculas de adesão célula-célula (CAMs) operam na maioria dos animais multicelulares, uma dependente e outra independente de cálcio e as moléculas dependentes de cálcio parecem ser primariamente responsáveis pela adesão celular que confere especificidade tecidual em estágios embrionários iniciais (WAGNER & WYSS, 1994).

As moléculas de adesão celular (CAMs) são moléculas de superfície que intermediam a adesão entre duas células de um mesmo tipo e entre células de origens teciduais diferentes. Muitos tipos de moléculas podem ser mediadores da adesão celular, mas a maioria faz parte da família das integrinas, das caderinas e da superfamília das imunoglobulinas (CHOTIA & JONES, 1997).

As integrinas formam uma classe de moléculas de adesão estruturalmente similares. São heterodímeros constituídos de subunidades α e β . As subunidades individuais α podem formar receptores funcionais com várias subunidades β diferentes entre si, e vice-versa, permitindo uma grande variedade de ligações célula-célula e célula-matriz (HYNES, 1992; HAASS *et al.*, 2005).

As moléculas da superfície celular, que são as moléculas de adesão intracelular (ICAM-1 e ICAM-2), as moléculas de adesão da mucosa (MadCAM-1), as moléculas de adesão vascular celular (VCAM-1) e as proteínas contidas na matriz extracelular (vitronectina, fibrinogênio, fibronectina e o iC3b do sistema complemento) são os ligantes preferenciais das integrinas (SPRINGER, 1994).

As caderinas constituem uma família de moléculas de adesão dependentes de cálcio. As primeiras caderinas que foram descobertas foram nomeadas de acordo com o tecido em que foram encontradas. Assim sendo, são classificadas em caderinas E (epitelial), P (placental) e N (neural). Estão expressas nas células que formam tecidos sólidos (JOHNSON, 1996). Na ausência de cálcio as caderinas sofrem alterações conformacionais e são degradadas por enzimas

proteolíticas (KOCH *et al.*, 1999). A perda da adesão, mediada pela E-caderina entre as células de melanoma e os queratinócitos, deixa as células de melanoma livres da regulação estrutural e funcional dos queratinócitos e resulta em aumento da motilidade, aumento da proliferação e do potencial invasivo das células de melanoma (McGARY *et al.*, 2002).

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) fazem parte da superfamília das imunoglobulinas. Estas têm participação significativa no prognóstico do melanoma, considerando a maior expressão da ICAM-1 em lesões malignas do que em lesões benignas. A expressão de ICAM-1 em melanomas primários tem relevância clínica, pois pacientes em estágio 1, com tumores e ICAM positivo, possuem prognóstico desfavorável e curto período de vida (NATALI *et al.*, 1997). A VCAM-1 é uma molécula de adesão celular vascular, que também está expressa no endotélio de peles normais em mínimas quantidades e em maior quantidade em melanoma maligno. É uma receptora para algumas integrinas, e facilita a adesão do melanoma ao endotélio vascular (HOLZMANN *et al.*, 1998).

As moléculas de adesão celular não agem isoladamente. Pelo contrário, a função de adesão de uma molécula é modulada pela atividade de outra molécula de adesão. Assim, a modulação dessas moléculas é uma alternativa relevante no tratamento de tumores malignos, como o melanoma metastático.

1.5 NOVAS ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO ANTITUMORAL

Com o propósito de alcançar resultados mais eficazes com os tratamentos antitumorais, o meio científico tem intensificado os estudos farmacológicos com compostos extraídos de plantas, bem como derivados sintéticos dos compostos naturais. Dentre estes, destacam-se os flavonóides os quais estão comumente presentes em várias plantas.

Os flavonóides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza. Mais de 4200 flavonóides são conhecidos, os quais são agrupados em diferentes classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas (ZUANAZZI, 2000). Estes compostos apresentam várias atividades farmacológicas importantes, dentre elas podemos destacar anticarcinogênica, antialérgica, antiulcerogênica, antiviral (ZUANAZZI, 2000). Muitos estudos têm demonstrado que os flavonóides são potentes inibidores de enzimas-chaves, que realizam a transdução de sinais celulares; inibem várias quinases, como a proteína C quinase (PCK), tirosina quinases ou lipídio quinases (AGULLO *et al.*, 1997); afetam várias vias metabólicas, como a glicolítica, pela ativação de enzimas ou pela síntese de proteínas (LEE *et al.*, 1994); promovem interrupção do ciclo celular nas fases G0/G1 ou G2/M, dependendo da sua estrutura e do modelo celular (LEPLEY *et al.*, 1996; LEPLEY & PELLING, 1997); interagem nos locais de ligação do estrogênio tipo II; regulam o crescimento de células mamárias (SCAMBIA *et al.*, 1993); e induzem a apoptose em diferentes linhagens celulares (KUNTZ *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000).

A respeito da atividade antitumoral dos flavonóides podemos destacar o trabalho realizado por Iwashita e colaboradores (2000). Eles demonstraram que os flavonóides do tipo isoliquiritigenina e buteina inibiram a proliferação celular e induziram a apoptose em linhagens celulares de melanoma B16F10. Nas células tratadas com estes compostos ocorreu a condensação do núcleo e a fragmentação do DNA nuclear (IWASHITA *et al.*, 2000), demonstrando assim que a morte celular induzida por estes compostos ocorreu através da via apoptótica.

Takahashi e colaboradores (2006), também demonstraram efeitos farmacológicos importantes do flavonóide isoliquiritigenina, este promoveu supressão da via ciclooxigenase (COX-2), tanto quanto a indução da apoptose em linhagens de células de adenocarcinoma de colon.

Além dos flavonóides existem outras moléculas obtidas do metabolismo secundário das plantas que são utilizadas como aditivos farmacêuticos e alimentícios. Estas podem também ser utilizadas na química fina como protótipos para a síntese de derivados. Neste contexto destaca-se o ácido gálico.

O ácido gálico é um fenol de ocorrência natural nas plantas, obtido através da hidrólise dos taninos. Consiste em uma estrutura fenólica trihidroxilada que possui várias atividades farmacológicas (INOUE *et al.*, 1995), as quais estão sendo amplamente investigadas.

Em sua função ácida, o ácido 3,4,5-triidróxi benzóico (nome químico do ácido gálico) permite a introdução dos mais variados substituintes, possibilitando, desta forma, a obtenção de inúmeros análogos ésteres com os mais distintos efeitos farmacológicos.

Os derivados do ácido gálico são amplamente utilizados na indústria alimentícia, como antioxidantes e na indústria de cosméticos e farmacêutica. Alguns estudos demonstram que estes compostos apresentam potentes atividades terapêuticas incluindo propriedades anticarcinogênica, antimicrobiana, anti-viral além de uma potente atividade antioxidante, atuando como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (OW & STUPANS, 2003; SAVI *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Kawada e colaboradores (2001), mostraram que o ácido gálico é capaz de induzir apoptose em linhagens celulares de câncer de pulmão humano. A associação de ácido gálico com cisplatina apresentou um aumento na apoptose das células tumorais quando comparado com o tratamento de cisplatina sozinha. Estes dados sugerem que a combinação do ácido gálico com outros fármacos antitumorais poderia ser efetiva em protocolos de tratamento do câncer de pulmão (KAWADA *et al.*, 2001).

Sakaguchi e colaboradores (1999), demonstraram que derivados do ácido gálico apresentaram maior citotoxicidade do que o ácido gálico em algumas linhagens de células cancerosas, com uma IC₅₀ que variou entre 2,9 a 114,4 µM, estas concentrações foram muito menores que a IC₅₀ do ácido gálico. O ácido gálico parece inibir a proliferação celular em cultura de células de tumor metastático como a P815 (mastócito murino), B16 (melanoma murino) e L5178 (linfoma murino), com IC₅₀ de 6,5; 8,0 e 3,6 µM respectivamente (OHNO, INOUE, OGIHARA, 2001). Estes

estudos demonstram uma possível aplicação do ácido gálico e ou de seus derivados no tratamento do câncer, especialmente no tratamento dos cânceres resistentes a fármacos antitumorais que vêm sendo utilizados na clínica (OHNO *et al.*, 1999).

Alguns pesquisadores associam a citotoxicidade destes compostos fenólicos com atividade pró-oxidativa, a qual pode acelerar o dano ao DNA, proteínas e carboidratos (GOMES *et al.*, 2003). No entanto, esta atividade pró-oxidante ainda não está totalmente esclarecida (SERGEDIENE *et al.*, 1999).

Alterações químicas na molécula do ácido gálico podem modificar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, pois alteram a solubilidade, o coeficiente de partição (log de P) e o grau de ionização. Leal (2004), esterificou a função ácida do ácido gálico com alcoóis alifáticos e obteve 14 derivados n-alquil-ésteres. Estes derivados diferem apenas no número de carbonos da cadeia alifática lateral e isto lhes atribui diferentes características físico-químicas, principalmente de lipofilicidade, avaliada pelo valor Log P (Tabela 1 e Figura 8).

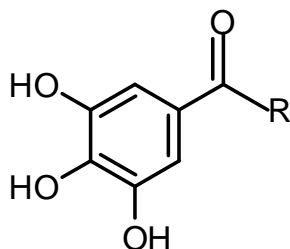


Figura 8. Estrutura química do ácido gálico, onde R é igual a OH

TABELA 1. ESTRUTURA QUÍMICA E VALORES DE $C \log P$ DOS *N*-ALQUIL-GALTOS ESTUDADOS

Número	Compostos	Radical (R)	$C \log P$
0	Ácido gálico	-OH	0,89
1	Metil galato	-CH ₃	0,92
2	Etil galato	-(CH ₂)-CH ₃	1,27
3	Propil galato	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	1,73
4	Butil galato	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	2,13
5	Pentil galato	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	2,53
6	Hexil galato	-(CH ₂) ₅ -CH ₃	2,92
7	Heptil galato	-(CH ₂) ₆ -CH ₃	2,32
8	Octil galato	-(CH ₂) ₇ -CH ₃	3,72
10	Decil galato	-(CH ₂) ₉ -CH ₃	4,51
11	Undecil galato	-(CH ₂) ₁₀ -CH ₃	4,90
12	Dodecil galato	-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	5,30
14	Tetradecil galato	-(CH ₂) ₁₃ -CH ₃	6,09
16	Hexadecil galato	-(CH ₂) ₁₅ -CH ₃	6,89
18	Octadecil galato	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	7,68

O Log P é uma das principais propriedades físico-químicas de uma determinada substância, pois expressa a lipossolubilidade relativa. Assim, quanto maior o valor de Log P, maior é a lipossolubilidade de um determinado composto químico e, conseqüentemente, maior é a sua interação com biomembranas.

Através de seu trabalho, Leal (2004), observou que os compostos com Log P entre 2,9 e 4,5 apresentaram uma atividade antifúngica *in vitro* mais efetiva, demonstrando a influência da hidrofobicidade nesta atividade biológica. Entretanto, foi possível observar que os compostos mais ativos não são os mais lipofílicos, demonstrando que há uma faixa ideal de Log P para um efeito fungicida mais efetivo.

Com base no estudo mencionado acima, nosso grupo iniciou o estudo de algumas atividades biológicas destas moléculas sintéticas em colaboração com os Professores Rosendo A. Yunes e Ricardo J. Nunes do Departamento de química da UFSC, os quais as sintetizaram. Inicialmente foi avaliada a atividade antioxidante em

que os derivados testados mostraram ser seqüestradores de ácido hipocloroso e inibidores da atividade da mieloperoxidase (ROSSO *et al.*, 2006). Estes derivados apresentaram também ação protetora contra a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil e pelo peroxinitrito (ROSSO, 2005).

Além da demonstração da atividade biológica relatada acima, nosso grupo também demonstrou que estes compostos apresentaram baixa toxicidade *in vitro*, uma vez que, quando incubados com fatias de fígado de ratos e/ou com linhagem de células não tumorais, que consiste de fibroblastos de rim de macaco (células VERO), os mesmos não foram citotóxicos em concentrações muito superiores as que apresentaram efeito antioxidante (SAVI *et al.*, 2005).

Outros pesquisadores também demonstraram que o ácido gálico, molécula precursora dos demais compostos estudados neste trabalho, não apresentou citotoxicidade em linfócitos humanos nas concentrações de até 4,17 mM (YANG *et al.*, 2001), bem como em estudos de toxicidade *in vivo*, o mesmo não apresentou efeito tóxico quando administrado em até 120 mg/Kg/dia em ratos (VAN DER HEIJDEN; JANSSEN, 1986).

No entanto, quando o ácido gálico e o lauril galato foram incubados com células tumorais mostraram importante efeito citotóxico em linhagens leucêmicas, de câncer de pulmão, mama e adenocarcinoma (INOUE *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2003; FIUZA *et al.*, 2004).

Com base nestes achados, nosso grupo iniciou o estudo da atividade antitumoral dos derivados do ácido gálico, focando maior interesse nos compostos que não estão disponíveis comercialmente. Deste modo estamos demonstrando neste trabalho a atividade antitumoral do ácido gálico e derivados em duas linhagens de células tumorais murinas, L1210 (linhagem de leucemia linfóide aguda) e B16F10 (linhagem de melanoma), bem como possíveis efeitos sobre o processo de metástases *in vivo*. Escolhemos estas duas linhagens tumorais, pois estes tipos de tumores não respondem satisfatoriamente ao tratamento quimioterápico disponível, além do que, a linhagem B16F10 é uma linhagem de alto poder metastático.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos antitumorais e toxicológicos do ácido gálico e *n*-alquil ésteres em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.1.1 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito citotóxico do ácido gálico e *n*-alquil ésteres (moléculas com 8, 10, 12 e 14 carbonos na cadeia lateral) na linhagem de células linfoblásticas leucêmicas L1210 e CEM e células de melanoma B16F10, bem como identificar a via de morte celular induzida por estes compostos;

Avaliar a influência da lipofilicidade na atividade antitumoral *in vitro*;

Investigar o efeito do ácido gálico e *n*-alquil ésteres sobre a síntese e concentrações intracelulares de glutathione, os efeitos pró-oxidantes e de liberação de espécies reativas intracelulares;

Avaliar a influência do ácido gálico e *n*-alquil ésteres sobre as concentrações de ATP das células de melanoma B16F10;

Verificar o efeito do ácido gálico e *n*-alquil ésteres na ativação do NF- κ B;

Avaliar o potencial antimetastático e verificar a sobrevivência;

Avaliar a toxicidade hepática e renal do tetradecil galato;

Avaliar os efeitos oxidativos da administração *in vivo* do tetradecil galato;

Verificar a concentração de glutathione após administração do tetradecil galato.

3. RESULTADOS

3.1 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, encontram-se nos próprios artigos. Os artigos estão dispostos da mesma forma que foram publicados na edição das revistas científicas (Artigo 1 e 2), ou na forma na qual foram submetidos (Artigo 3).

3.1.1 ESTUDOS *IN VITRO*

3.1.1.1 Efeito Antitumoral do Ácido Gálico e *n*-alquil Ésteres em diferentes linhagens celulares

3.1.1.2 Artigo 1

**Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210
leukemia cells**

Locatelli C., Rosso R., Santos-Silva M.C., de Souza C.A., Licínio M.A.,
Leal P., Bazzo M.I., Yunes R.A., Creczynski-Pasa T.B.

Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16:3791-3799, 2008



Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells

Claudriana Locatelli,^{a,c} Rober Rosso,^a Maria C. Santos-Silva,^b
Camila A. de Souza,^b Marley A. Licínio,^a Paulo Leal,^d
Maria L. Bazzo,^b Rosendo A. Yunes^d and Tânia B. Creczynski-Pasa^{a,*}

^aDepartamentos de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476 Florianópolis, 88040-900 SC, Brazil

^bAnálises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476 Florianópolis, 88040-900 SC, Brazil

^cCurso de Farmácia, Universidade do Contestado, Campus Caçador, 89500-000 Caçador, SC, Brazil

^dQuímica, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476 Florianópolis, 88040-900 SC, Brazil

Received 6 December 2007; revised 25 January 2008; accepted 25 January 2008

Available online 31 January 2008

Abstract—Gallic acid and gallates with the same number of hydroxyl groups and varying the length of the side carbon chain, with respective lipophilicity being defined through the Clog P values, were examined for their ability to induce apoptosis (through the DNA ladder fragmentation pattern), mitochondrial and cytoplasmic GSH depletion and NF- κ B activation in murine lymphoblastic L1210 leukemia cells. A relationship between cytotoxic effect and a limited degree of lipophilicity was observed.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The greatest problem associated with acute leukemia is the resistance to systemic methods of treatment and despite advances in the therapies 20–30% of the patients die.¹ Leukemia therapy with anticancer compounds is based on cell growth inhibition, induction of cell death through apoptosis or leukemic blast differentiation.^{1,2} Cell death through apoptosis can result from several cellular events, occasioned frequently by oxidative metabolism alteration,³ and glutathione, the most important intracellular antioxidant complex, is directly involved in this process.⁴ The last step of apoptosis, cell death, is promoted by the activation of caspases, leading to changes characteristic of apoptotic cells such as DNA fragmentation, chromatin condensation, cell shrinkage, and membrane blebbing.¹

During oxidative or nitrosative stress, the decrease in glutathione (GSH) and increase in oxidized glutathione

(GSSG) intracellular concentrations are associated with the upregulation of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) expression,⁵ which is mediated by NF- κ B activation.⁶ The phosphorylation of I κ B leads to NF- κ B activation with the consequent liberation of p50 and p65 subunits, resulting in anti- or pro-apoptotic protein synthesis in the nucleus.⁷

Several recent studies have shown that the alteration of mitochondrial function is a key event in apoptotic cascade. Antitumoral drugs may damage mitochondria since they induce an increase in the permeability of the mitochondrial membrane.⁸ These changes are associated with the collapse of the membrane potential, promoting intracellular ATP depletion and inhibiting ATP synthesis. The damage on the mitochondrial membrane is triggered by the generation of reactive oxygen species (ROS) and/or depletion of intracellular and intramitochondrial GSH.⁹ These events alter the mitochondrial redox ratio and intracellular pH and induce the translocation of cytochrome c to the cytosol.^{8,9}

Gallic acid and its analogs have been shown to be involved in a wide variety of biological actions. Gallic acid is an intermediary component of plant metabolism.^{10–15} The biological activity of gallic acid and its analogs has

Keywords: Gallic acid ester derivatives; Leukemia; Apoptosis; Lipophilicity; NF- κ B; GSH; Oxidative stress.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 8057; fax: +55 48 3721 9542; e-mail: taniac@mbox1.ufsc.br

been described as antioxidant,¹⁶ antifungal,¹⁷ antibacterial,¹⁸ antimalarial,¹⁹ antitumoral,²⁰ and antiherpetic.¹⁵ However, the main interest in gallic acid derivatives is related to its antitumoral activity. Lauryl, methyl, and propyl gallate induce apoptosis in tumor cell lines and inhibit lymphocyte proliferation.²⁰ Other previous studies suggest that apoptosis induced by gallic acid and its analogs is associated with oxidative metabolism alterations, mitochondrial dysfunction,²¹ an increase in intracellular Ca^{2+} levels (causing caspase activation)^{21,22} and DNA fragmentation.²³

The objective of this study was to investigate the effect of 14 gallic acid derivatives toward a lymphoblastic leukemia cell line, monitoring the oxidative stress induced through GSH content depletion. The influence of the side carbon chain length (ClogP) of the compounds on cytotoxic activity was also analyzed. Additionally, some biochemical and molecular mechanisms possibly related to the cytotoxicity of these compounds are discussed.

2. Results

In order to screen and compare the cytotoxicity induced by the 14 ester derivatives of gallic acid the compounds were assayed with the L1210 cell line at 100 μM for 24 h. Concentration–time–response curves were obtained for the more active compounds. The compound concentrations analyzed were 0, 1, 10, 25, 50, 75, and 100 μM . The cell death was evaluated after 24, 48, and 72 h of incubation with the compounds by monitoring the mitochondrial activity. Figure 1(A–F) shows the time–concentration–response versus percent of viable cells for the compounds that promoted more than 50% of cell death. It is possible to observe that for all compounds minimum incubation time to reach their maximum effect was about 24 h. Figure 1 shows also that compounds 10, 11, 12, and 14 reached their maximum effect in 48 h of incubation.

Following the procedure described for L1210, all compounds were also tested with CEM cells, a human leukemia cell line. Figure 2 shows the concentration–response curve versus percent of viable cells for the more active compounds and in Table 2 are summarized the IC_{50} values for cell toxicity for both cell lines.

In Figure 3 the relation between ClogP and cell death is shown. The effective compounds have ClogP values between 3.32 and 6.09. The ClogP values of all compounds are also listed in Table 1.

In order to investigate whether cell death was induced through apoptosis, the cells of both cell lines were incubated with compounds 0, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, and 16 at 30 μM and 100 μM for 24 h. After incubation the DNA was extracted and analyzed. As shown in Figure 4, all of the *n*-alkyl-esters of gallic acid tested induced the internucleosomal breakdown of DNA chromatin (in both cell lines), resulting in ladder-like agarose electrophoretic patterns of degraded DNA products.

In a previous work, the gallic acid derivatives were tested for their cytotoxicity and genotoxicity toward a non-tumoral cell line (VERO)¹⁵ and the IC_{50} values for both activities were found to be much greater than those for L1210 and CEM cell lines cytotoxicity evaluated in this work. The cytotoxic and genotoxic concentrations for VERO cells were above 1 mM and 200 μM , respectively.

Figure 5 (left) and (right) show that compounds 0, 7, 8, 10 and 11, 12, 14, 16, respectively, were able to decrease GSH levels significantly. Furthermore, compound 14 was able to decrease the intracellular GSH level in a concentration-dependent manner. This compound started to induce a significant reduction in cell GSH content at concentrations relatively high ($\geq 50 \mu\text{M}$). Compound 8 decreased the GSH concentration by approximately 50% at 100 μM , whereas with the other compounds the decrease in GSH levels reached 75–90% at the same concentration.

As can be seen in Figure 6 (left and right), compounds 8 and 10, and compounds 11, 12, 14, 16, respectively, were also able to reduce the mitochondrial GSH content, although only at high concentrations, between 75 and 100 μM . In particular, compound 8 depleted the mitochondrial GSH content more intensively than the cytoplasmic GSH, and compound 7 did not alter the mitochondrial GSH content at all.

In order to access whether NF- κB p65 was involved, its expression was evaluated. The results of the immunoblotting are shown in Figure 7, where it can be observed that only compound 8 (*n*-octyl gallate) was able to increase significantly the peptide expression.

3. Discussion

Although several types of pharmacological activity have been reported for gallic acid and its derivatives, there have been no systematic studies addressing the issue of the relationship between the lengths of the side carbon chain and antitumoral activity, particularly against leukemia.

The gallic acid ester derivatives showed cytotoxic effect toward the L1210 cells in a concentration-dependent manner (Fig. 1). It was possible to observe that the major difference between these molecules considering the variation in the cytotoxic potential is due to the carbon chain length. The compounds with ClogP values between 3.32 and 6.09 were more active (Fig. 3), in agreement with previous results obtained for the antioxidant activity of these compounds.¹⁵ However, in a previous study, the greatest cytotoxic effect on human adenocarcinoma cells (HeLa) was obtained for propyl gallate, with a ClogP of 1.7.¹² In our study, a relation between cytotoxicity and alkyl chain length was observed. Compounds 8, 10, 11, 12, 14, displayed a considerably more pronounced cytotoxic effect (Fig. 1). It has been previously proposed that the lipophilicity of these compounds increases with alkyl chain length, increasing

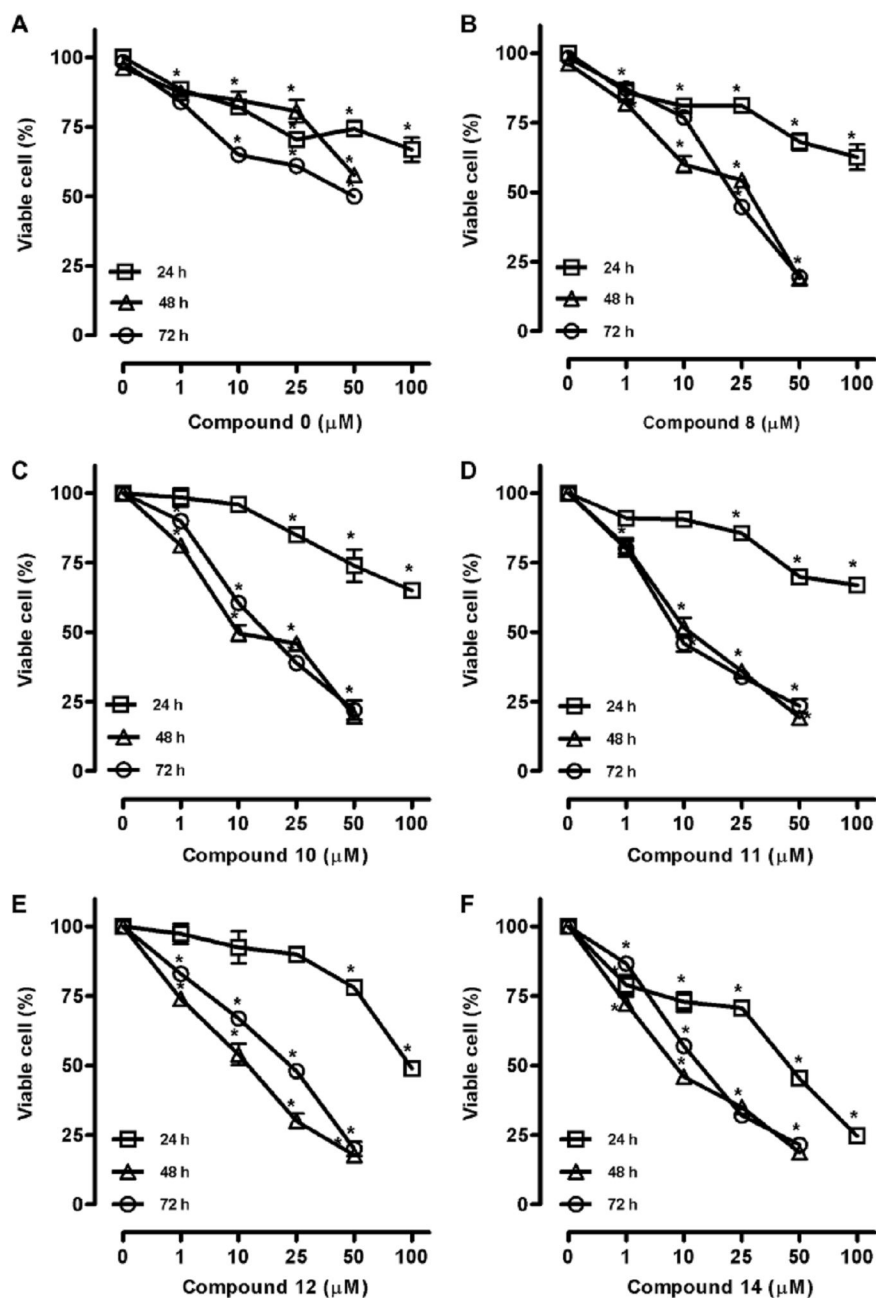


Figure 1. Concentration and time-response curve \times cell viability for gallic acid derivatives using L1210 cell line. Cell viability was assayed by MTT. Results are expressed as percentage of viable cells of drug-treated samples in comparison to the control samples (100%). * $p < 0.05$.

their affinity for the lipid bilayer of the cellular membrane, thus influencing their interaction and/or entrance into the cells.¹² Moreover, the hydroxyl groups in the phenolic ring are essential for the biological activity, since 100 μM of trimethoxy benzoic acid and trimethoxy

decyl gallate, both gallic acid derivatives, did not show toxicity toward L-1210 cells (results not shown).

Figure 3 shows the ladder-like agarose electrophoretic pattern of the DNA extracted from L-1210 cells treated

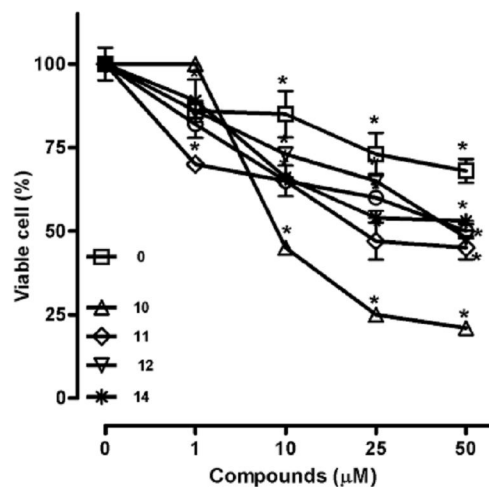


Figure 2. Concentration–response curve \times cell viability for gallic acid derivatives using CEM cell line. The cells were incubated for 48 h with compounds 0 and 8–14. Cell viability was assayed by MTT. Results are expressed as percentage of viable cells of drug-treated samples in comparison to control samples (100%). * $p < 0.05$.

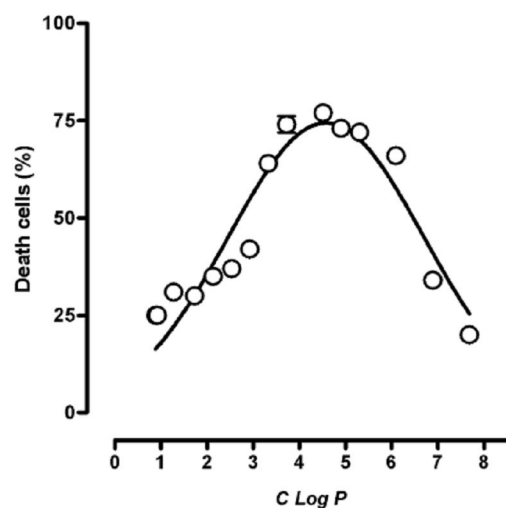
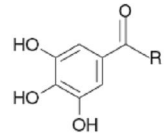


Figure 3. Relationship between cytotoxic activity and compound lipophilicity. The line is simply a visual guide.

with gallic acid and its derivatives. The fact that hydrophobicity is so important is highlighted by the finding that seven of the fourteen compounds were able to induce DNA damage. This may be due to a better permeation through the cell membrane by this type of compound or/and a better interaction of the compound with the membrane receptor(s) or membrane enzyme(s).²⁰ These results suggest that the less lipophilic compounds were less efficient at reaching the interior of the cell or sending a signal to the interior of the cell

Table 1. Chemical structures and Clog P values of gallic acid n -alkyl ester derivatives

			
No	Gallates	–R	Clog P
0	Gallic acid	–OH	0.89
1	Methyl	–CH ₃	0.92
2	Ethyl	–(CH ₂)–CH ₃	1.27
3	Propyl	–(CH ₂) ₂ –CH ₃	1.73
4	Butyl	–(CH ₂) ₃ –CH ₃	2.13
5	Pentyl	–(CH ₂) ₄ –CH ₃	2.53
6	Hexyl	–(CH ₂) ₅ –CH ₃	2.92
7	Heptyl	–(CH ₂) ₆ –CH ₃	3.32
8	Octyl	–(CH ₂) ₇ –CH ₃	3.72
10	Decyl	–(CH ₂) ₉ –CH ₃	4.51
11	Undecyl	–(CH ₂) ₁₀ –CH ₃	4.90
12	Dodecyl	–(CH ₂) ₁₁ –CH ₃	5.30
14	Tetradecyl	–(CH ₂) ₁₃ –CH ₃	6.09
16	Hexadecyl	–(CH ₂) ₁₅ –CH ₃	6.89
18	Octadecyl	–(CH ₂) ₁₇ –CH ₃	7.68

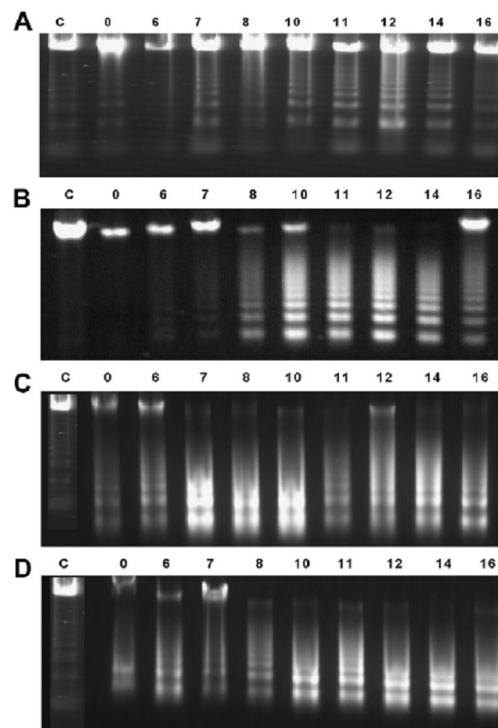


Figure 4. DNA fragmentation in L1210 and CEM cells induced by gallic acid derivatives. L1210 cells (5×10^6) were treated with the compounds (A) 30 μ M and (B) 100 μ M for 24 h. CEM cells (5×10^6) were treated with the compounds (C) 30 μ M and (D) 100 μ M for 24 h. The DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis as described in Section 5.

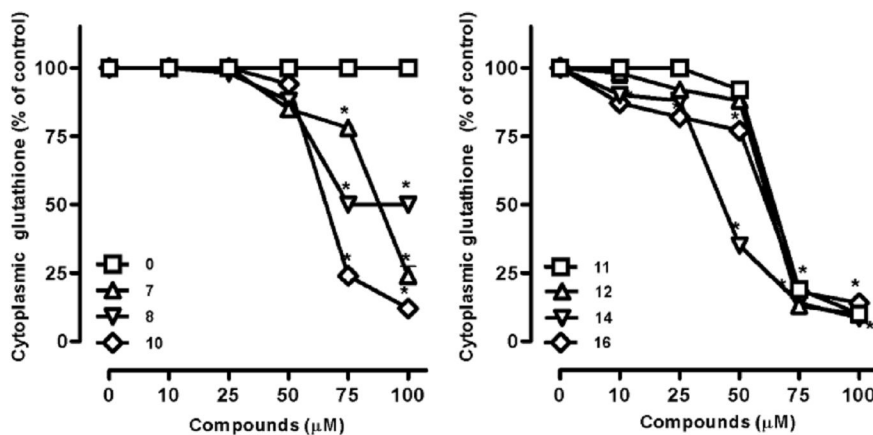


Figure 5. Effect of gallic acid and its derivatives on cytoplasmic glutathione content in L1210 cells. The samples were processed for GSH determination spectrophotometrically as described in Materials and Methods. The values were expressed as percentage of glutathione in relation to the control (100% of glutathione = 0.756 ± 0.015 μmol of GSH). * $p < 0.05$.

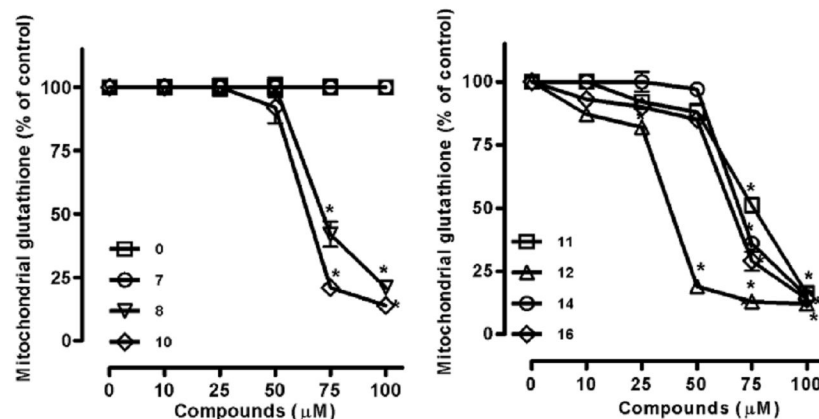


Figure 6. Effect of gallic acid and its derivatives on mitochondrial glutathione content in L1210 cells. The samples were processed for GSH determination spectrophotometrically as described in Section 5. The values were expressed as percentage of glutathione in relation to the control (100% of glutathione = 1.657 ± 0.026 μmol of GSH). * $p < 0.05$.

inducing the cell death, because the more lipophilic compounds, with $\text{Clog } P$ values above 2.9, had a greater potential for DNA fragmentation in comparison with compounds with $\text{Clog } P$ values below 2.9. Even so, there is an upper limit of lipophilicity for a compound to be able to reach the DNA, or to reach any other target that can induce DNA fragmentation.

Assuming that gallic acid is also able to induce apoptosis in tumor cells,²³ we promoted chemical alterations in the molecule and observed that the changes could influence the cytotoxicity. These simple structural modifications to the gallic acid molecule induced changes in its physico-chemical properties, including the solubility and partition coefficient ($\text{Clog } P$). Besides changes in the diffusion potential through the lipid membranes

can also affect the interactions of the molecules with their intracellular targets, since the orientation of the head group, as well as total lipophilicity, is the determinant for the pharmacological activity.²⁴

The drug interaction with the cell membrane allows the activation of caspases which may start the apoptotic process and cause DNA fragmentation, a possible mechanism of action of the compounds tested in this work. This suggestion came from the observation that for the same compounds there were different relationships between their lipophilicity and the biological activity. However, some assays were carried out with an enzyme preparation and some with a reaction medium for HOCl scavenging. Consequently, the compounds did not need to cross the bilayer barrier of

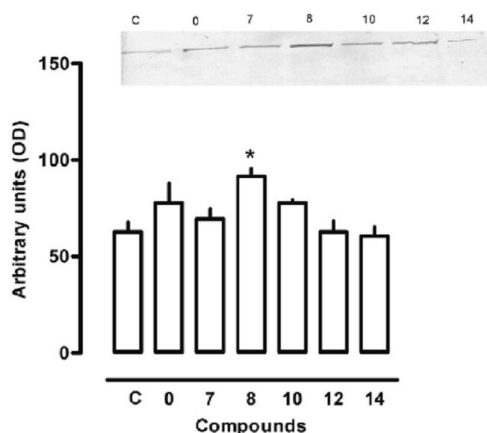


Figure 7. Expression of NF- κ B in L1210 cells induced by gallic acid derivatives. The samples were analyzed by immunoblotting as described in Section 5. Lane 1, control cells; compounds 0, 7, 8, 10, 11, 16 correspond to lanes 2, 3, 4, 5, 6, 7. The bands were quantified by densitometry, using Scion Image Software, $n = 3$, $p < 0.05$.

a whole cell; the compounds with Clog P between 0.92 and 2.92, (methyl to hexyl gallates) were the strongest inhibitors of myeloperoxidase activity and all of them were active scavengers of HOCl.²⁵ Kobayashi et al.^{26,27} suggested a similar mechanism for other gallic acid derivatives. Furthermore, the alkyl chain size appears to be very important for the membrane interactions with gallates. It has been demonstrated, using the Caco-2 cell membrane as a model of permeability, that methyl (Clog $P = 0.9$) and propyl (Clog $P = 1.73$) gallates were able to cross the cell membrane and octyl gallate (Clog $P = 3.72$) was not.²⁸

In general, the GSH depletion increases the sensitivity of tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating compounds and ionizing radiation.²⁹ The compounds tested here promoted cytoplasmic GSH depletion (Fig. 5). This result suggests that an irreversible binding of these substances with glutathione may occur without the formation of GSSG. During oxidation, the decrease in GSH levels are associated with the upregulation of γ -GCS expression,^{29,30} which is mediated by NF- κ B activation.^{31,32}

The compounds were also able to deplete the mitochondrial GSH content (except heptyl galate) and, although observed only with high concentrations, they may be implicated in a redox potential alteration inducing cell death through apoptosis (Fig. 4), probably through cytochrome c release. Compound 12 was the most active in terms of mitochondrial GSH depletion perhaps because it is the most active compound toward both cell lines (Table 2). Compound 7 probably induces cell death through apoptosis via another mechanism.

Our results demonstrated that only compound 8 increased the constitutive activity of NF- κ B in leukemia cells (Fig. 7). Moreover, the compounds that did not influence the NF- κ B activation were stronger inducers of GSH depletion. These results suggest that these compounds impede the glutathione synthesis provoking an imbalance in intracellular oxidative metabolism and cell death by apoptosis. Thus, we suggest that compound 8 may induce oxidative stress and consequently GSH depletion, since it decreases the cell viability, although it promotes the recovery of GSH concentration by NF- κ B activation. However, other mechanisms of action, such as the induction of pro-apoptotic protein expression,³³ cannot be discarded.

Several studies have shown that NF- κ B activation occurs via compounds that induce oxidative stress and are able to activate Fas and TNF-induced AP-1 binding is inhibited.^{33–35} Some chemotherapy compounds, such as doxorubicin and its analogs, activate NF- κ B, and this is essential in terms of the cytotoxic effects.³⁶ Perhaps gallic acid derivatives act differently in the apoptotic process and compound 8 may promote cell death through Fas activation or inhibition of TNF-induced AP-1 binding which is able to promote NF- κ B activation. The NF- κ B activation promotes the downregulation of bcl-2 translocation of bax, and upregulation of p-53 induced apoptosis in human aortic endothelial cells.³⁴ Concerning Fas activation, gallic acid apoptosis induction in 3T3 pre-adipocytes via a mitochondrial pathway has been described.³⁷ Compounds 10, 11, 12, and 14 tested here seem to promote apoptosis through GSH depletion. On the other hand, since gallic acid derivatives can promote intracellular Ca^{2+} changes,²² the apoptosis induction may occur through the alteration of the mitochondrial permeability, resulting in the unlocking of the pore, followed by the release of cytochrome c and activation of caspases.

Table 2. Comparison between the IC₅₀ values of the *n*-alkyl gallates for cell viability in L1210 and CEM cell lines

Compound	L1210 IC ₅₀ (μM)		CEM IC ₅₀ (μM)	
	48 h	72 h	48 h	72 h
0	>50	50	>50	>50
8	22	22	50	43
10	12.2	15.5	9.8	20
11	11.33	8.12	21	31.8
12	10.9	21	47.4	22
14	8.5	12.5	>50	28.6

4. Conclusions

In general, new anticancer drugs are expected to induce at least cell death induction through apoptosis. In the carcinogenesis process the cell cycle is deregulated and apoptosis is suppressed; these are the minimal conditions for neoplastic progression.³⁸ Although the mechanism by which these gallic acid derivatives induce apoptosis was not precisely defined, membrane perturbation and generation of reactive species which promote cytoplasmic GSH and mitochondrial GSH depletion may be involved. Further studies are being developed by our group targeting the mechanism of action of the five active compounds shown here, as well as complementary aspects regarding the structure–activity relationship with analogs modified in the ring. The results described here together with those reported in the literature indicate that the compounds may act on different targets, as observed for compounds 7 and 8. Compound 8 was the only one able to increase the NF κ B expression; lauryl gallate (our compound 12) acts by blocking the tyrosine phosphorylation³⁹; and the alkyl length and degree of hydroxylation of gallates drive their interaction with the cell membranes.^{28,37}

5. Experimental

5.1. Chemicals

The cell culture media, serum, and antibiotics were purchased from GIBCO (São Paulo, Brazil), the rabbit polyclonal NF- κ B p65 antibody from Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA) and all other reagents from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Rainbow markers and PVDF membranes were obtained from Hybond-P, Amersham Biosciences, San Francisco, CA. The compounds were synthesized and characterized as described elsewhere¹⁵ and numbered according to the size of the carbon chain, as specified in Table 1, as 0 (gallic acid) and from 1 to 18 C (compounds with 9, 13, 15, and 17 C were not obtained). The compounds were dissolved in 100% of dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck), and diluted in cell culture medium to a final concentration of 0.01% of DMSO.

5.2. Clog *P* determination

The Clog *P* values were obtained using the commercially available software Tsar 3D version: 3.3 from Oxford Molecular Ltd.⁴⁰

5.3. Cell culture

Two cell lines of lymphoblastic leukemia were used namely L-1210, of murine origin, and CEM, of human origin (ATCC, Manassas, VA). Both cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 10 mM Hepes, pH 7.4, at 37 °C, in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Every 2–3 days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replacing it with fresh medium.

5.4. Viability assay

The cell incubations with the compounds were carried out for 24, 48, and 72 h with cell densities (cell/0.2 mL) of 3×10^5 , 7.5×10^4 , and 5×10^4 , respectively. The amounts of the cells for each incubation time were determined taking into account 100% of viability under each condition. Cell viability was monitored using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.⁴¹ A control was run in parallel to monitor the influence of DMSO on the assays. The control with solvent did not show a statistical difference from the control with cells alone.

5.4.1. Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis. The isolation of apoptotic DNA fragments was based on the method of Han.⁴² For this, 2×10^6 L1210 cells were treated with the compounds for 24 h. The cells were then washed with cold PBS and incubated with lyses buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 g/L proteinase K) at 50 °C for 2 h. The DNA was then precipitated with 2.5 vol of ethanol at 25 °C overnight and dried in air. After washing with ice-cold 70% ethanol, the pellets were dissolved in TE buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, and 0.6 g/mL RNase A and further incubated at 37 °C for 1 h. Horizontal electrophoresis was performed at 200 V in 1.5% agarose gel with TAE (Tris-acetic acid and EDTA) as the running buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized by 2UV Transilluminator (MacroVue UV-20 Hoefer) for ladder formation.

5.4.2. Glutathione measurement. Total glutathione (GSH + GSSG) was measured using the glutathione reductase method.⁴³ Briefly, 1×10^6 cells were washed in PBS, resuspended in chilled Milli-Q water containing 1 mM EDTA and sonified for 10 s. About 20 μ L of each homogenate was then transferred to a 96-well plate followed by the addition of the solution (75 μ M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB; 120 μ M NADPH, 1 U/mL glutathione reductase, and 10 mM EDTA in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4). The absorbance was measured after 15 min at 412 nm using a Microwell Systems (Organon Teknika). The values were expressed as percentage of the control. The control absorbance considered as 100% was that for glutathione (0.756 ± 0.015 μ mol GSH/ 1.10^6 cells/0.5 mL).

5.4.3. Mitochondrial glutathione measurement. Briefly, 1×10^6 cells were washed in PBS, homogenized in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 250 mM sucrose. After that the cells were incubated on ice for 15 min and centrifuged at 1500g for 10 min, at 4 °C. The mitochondrial extract was resuspended in chilled Milli-Q water containing 1 mM EDTA and sonified for 10 s. The total mitochondrial glutathione (GSH + GSSG) was measured using the glutathione reductase method⁴³ as explained above. The control absorbance considered as 100% was that for glutathione (1.657 ± 0.026 μ mol GSH/ 1.10^6 cells/0.5 mL).

5.4.4. Preparation of nuclear extracts. Nuclear extracts were obtained as described previously.⁴⁴ Briefly, cells (5×10^6 cells/mL) were incubated in ice-cold lyses buffer A (10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, and 0.5 mM PMSF). After incubation (15 min), NP-40 was added (0.5%, v/v) and centrifuged (1810g; 5 min at 4 °C). Nuclear pellets were suspended in ice-cold buffer C (20 mM Hepes, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 µg/mL pepstatin, 1 µg/mL leupeptin, and 20% (v/v) glycerol and 1 mM EDTA, EGTA, PMSF, and dithiothreitol) and incubated for 30 min. Nuclear proteins were collected in the supernatant after centrifugation (12,000g; 10 min at 4 °C). The total protein content was determined by the Bradford method.⁴⁵

5.4.5. Immunoblotting analysis. Nuclear lysates were denatured in a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.001% bromophenol blue) and heated in a bath of boiling water for 3 min. Samples (30 µg total protein) were run in 12% SDS-PAGE and the proteins were transferred to PVDF membranes. Rainbow markers were run in parallel. The PVDF membranes were blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% milk) and incubated overnight with rabbit polyclonal anti-NFκB antibody (1:1000 dilution with Tween-TBS). The membranes were then washed with Tween-TBS, followed by incubation (1 h) with anti-rabbit IgG antibody biotin-conjugated (1:1000) with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:1000). Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine staining. The bands were quantified by densitometry, using Scion Image Software (Scion Co, Frederick, Maryland, USA).

5.4.6. Statistical analysis. The results were presented as means ± SD of triplicates from three-independent experiments. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's *t*-test, and *p* < 0.05 was taken as statistically significant.

Acknowledgments

This study was supported by grants and fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina). This paper was part of the Master's degree and Ph.D. work of Rober Rosso and Claudiana Locatelli, respectively, of the Pharmacy post-graduation course. The group thank the Hospital Universitário (HU) for the use of their facilities.

References and notes

- Schuler, D.; Szende, B. *Leukemia Res.* **2004**, *28*, 661.
- Okada, H.; Mak, T. W. *Nat. Rev.* **2004**, *4*, 592.
- Sakaguchi, N.; Inoue, M.; Ogihara, Y. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1973.
- Sies, H. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 916.
- Rahman, I.; MacNee, W. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1405.
- Manna, S. K.; Kuo, M. T. *Oncogene* **1999**, *18*, 4382.
- Shishodia, S.; Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1071.
- Balaban, R. S. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **2006**, *291*, c1107.
- Slater, A. F. G.; Stefan, C.; Nobel, I.; Van den Dobbels-teen, D. J.; Orrenius, S. *Toxicol. Lett.* **1995**, *83*, 149.
- Mahmoud, N. N.; Carothers, A. M.; Grunberger, D.; Belinski, R. T.; Churchill, M. R.; Martucci, C.; Newmark, H. L.; Bertagnolli, M. M. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 921.
- Hertog, M. G.; Feskens, E. J.; Hollman, C. P.; Katan, M. B.; Kromhout, D. *Lancet* **1993**, *342*, 1007.
- Fiuzza, S. M.; Gomes, C.; Teixeira, L. J.; Girão da Cruz, M. T.; Cordeiro, M. N. D. S.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M. P. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3581.
- Stahl, W.; Sies, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *30*, 101.
- Grundhofer, P.; Niemetz, R.; Schilling, G.; Gross, G. G. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 915.
- Savi, L. A.; Leal, P. C.; Vieira, T. O.; Rosso, R.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Creczynski-Pasa, T. B.; Barardi, C. R. M.; Simões, C. M. O. *Arzneim.-Forsch.* **2005**, *55*, 66.
- Klein, E.; Weber, N. J. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 1224.
- Mahadevan, A.; Reddy, M. K. *J. Plant Pathol.* **1968**, *74*, 87.
- Isoyama, N.; Okazoe, K.; Ichimura, N.; Sugihara, Y.; Kono, T. *Nichidai Igaku Zasshi* **1968**, *27*, 270.
- Thompson, P. E.; Moore, A. M.; Reinertson, W. *J. Antibiot. Khimioter.* **1953**, *3*, 399.
- Serrano, A.; Palacios, C.; Roy, G.; Cespon, C.; Villa, M. L.; Nocito, M.; Gonzales-Porque, P. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *350*, 49.
- Roy, G.; Lombardia, M.; Palacios, C.; Serrano, A.; Cespon, C.; Ortega, E.; Eiras, P.; Lujan, S.; Revilla, Y.; Gonzalez-Porque, P. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *383*, 206.
- Isuzugawa, K.; Inoue, M.; Ogihara, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 844.
- Inoue, M.; Suzuk, R.; Koide, T.; Sakaguchi, N.; Ogihara, Y.; Yabu, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 898.
- Bennett, C. J.; Caldwell, S. T.; McPhail, D. B.; Morrice, P. C.; Duthie, G. G.; Hartley, R. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2079.
- Rosso, R.; Vieira, T. O.; Leal, P. C.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Creczynski-Pasa, T. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6409.
- Philchenkov, A. *J. Cell. Med.* **2004**, *8*, 432.
- Kobayashi, H.; Oikawa, S.; Hirakawa, K.; Kawanishi, S. *Mutat. Res.* **2004**, *558*, 111.
- Tammela, P.; Laitinen, L.; Galván, A.; Wennberg, T.; Hczko, R.; Vuorela, H.; Stote, P.; Vuorela, P. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *425*, 193.
- Rothbarth, J.; Vahrmeijer, A. L.; Mulder, G. J. *Chem. Biol. Interact.* **2002**, *140*, 93.
- Hamilton, D.; Fotouhi-Ardakani, N.; Batist, G. *Cancer Treat. Res.* **2002**, *112*, 67.
- Manna, S. K.; Kuo, M. T.; Aggarwal, B. B. *Oncogene* **1999**, *18*, 4371.
- Santos-Silva, M. C.; Freitas, M. S.; Assreuy, J. *Leukemia Res.* **2006**, *30*, 145.
- Meyskens, F. L., Jr.; Buckmeier, J. A.; McNulty, S. E.; Tohidian, N. B. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1197.
- Meyer, M.; Pahl, H.; Bauerle, P. A. *Chem. Biol. Interact.* **1994**, *91*, 91.

35. Ashikawa, K.; Shishodia, S.; Fokt, I.; Pribe, W.; Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 353.
36. Bian, X.; McAllister-Lucas, L. M.; Shao, F.; Schumacher, K. R.; Feng, Z.; Porter, A. G. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48921.
37. Hsu, C. L.; Lo, H. W.; Yen, C. G. *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 7359.
38. Evan, G. I.; Voudsen, K. H. *Nature* **2001**, *411*, 342.
39. Sabki, K.; You, A.; Isemura, M.; Abe, I.; Seki, T.; Noguchi, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 1391.
40. Tools for Structure Activity Relationships (TSAR 3D) Oxford Molecular Ltd. Copyright, 2000.
41. Van De Loosdrecht, A. A.; Nennie, E.; Ossenkoppele, G. J.; Beelen, R. H.; Langenhuijsen, M. M. *J. Immunol. Meth.* **1991**, *141*, 15.
42. Han, R. Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques, Pekin Medical University, Pekin Union Medical Collage Joint Publishing House, Beijing, 1997, 395.
43. Tietze, F. *Anal. Biochem.* **1969**, *27*, 502.
44. Dignam, J. D.; Lebovitz, R. M.; Roeder, R. G. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *5*, 1475.
45. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.

3.1.1.3 Artigo 2

Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death

Locatelli C., Leal P.C., Yunes R.A., Nunes R.J., Creczynski-Pase T.B.

Chemico Biological Interaction, 2009

[doi:10.1016/j.cbi.2009.06.019](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.019)



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death

Claudriana Locatelli^{a,c}, Paulo C. Leal^b, Rosendo A. Yunes^b, Ricardo J. Nunes^b, Tânia B. Creczynski-Pasa^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, CP 476 Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, CP 476 Florianópolis, SC, Brazil

^c Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, Campus Caçador, 89500-000 Caçador, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2009

Received in revised form 23 June 2009

Accepted 24 June 2009

Keywords:

Gallic acid derivatives

Apoptosis

Melanoma

Free radicals

NF- κ B

Cell adhesion

ABSTRACT

Malignant melanoma is a lethal disease, and the incidence and mortality associated with it are increasing worldwide. It has a significant tendency to develop both metastasis and resistance to chemotherapy. The tumor cells show abnormal redox regulation, and although the molecular mechanisms involved are not well characterized, they seem to be related to oxidative stress. In a previous study, we showed the antitumoral properties of gallic acid ester derivatives in leukemia cells. Here, we show the effect of octyl, decyl, dodecyl and tetradecyl gallates on B16F10 cells, a melanoma cell line. All compounds induced cytotoxic effects, and the IC_{50} values obtained were between 7 μ M and 17 μ M after 48 h of incubation. Cell death occurred through apoptosis, as demonstrated by the genomic DNA fragmentation pattern. The gallates were able to induce significant production of free radicals, deplete both glutathione and ATP, activate NF- κ B and promote the inhibition of cell adhesion under the experimental conditions. The glutathione depletion induced by these compounds was related to the inhibition of γ -glutamylcysteine synthase activity. These results suggest that gallates induce tumoral cell death through apoptosis as a consequence of oxidative stress, though they use different mechanisms to do so. These findings are important since melanoma cells are resistant to death because of their high level of antioxidant defense, adhesion capability and propensity to metastasize.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Melanoma is highly resistant to conventional chemotherapy; it is an invasive disease that shows preferential metastasis to the brain, lung, liver, and skin [1]. The redox regulation in melanoma cells is abnormal, and redox-modulating agents can induce cell apoptosis. Among the various targets suggested for apoptosis, much attention has been given to intracellular redox status [2]. A growing body of evidence indicates that intracellular thiol redox status is one of the key mediators of apoptosis in many cell systems [2]. Several studies have demonstrated that melanoma cells have a decreased ability to handle oxidative stress compared with normal melanocytes, resulting in a continuous build-up of reactive oxygen species (ROS) [3]. Glutathione depletion induces the accumulation of ROS, leading to cell death [4]. Indeed, it has been observed that intracellular glutathione content is inversely proportional to the susceptibility of different tumor cell lines to arsenic trioxide, an apoptosis-inducing agent [3]. Additionally, the oxidation of a critical thiol residue in the mitochondrial membrane can cause transition pore opening, leading to an increase in permeability and apoptosis [5]. These findings suggest that thiol groups in the reduced form are important for maintaining cellular function and/or mitochondrial

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; ($\Delta\psi_m$), mitochondrial membrane potential; ATP, adenosine triphosphate; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; NF- κ B, nuclear factor kappa B; AP-1, activator protein 1; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GT, total glutathione; γ -GCS, γ -glutamylcysteine synthetase; I- κ B, kappa B inhibitor; NOAEL, no-observed-adverse-effect-level; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; HCl, chloridric acid; NP-40, nonyl phenoxypolyethoxyethanol; PBS, phosphate buffer; DTNB, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid; NADPH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; $MgCl_2$, magnesium chloride; KCl, potassium chloride; SOD, superoxide dismutase; Trolox®, a water-soluble vitamin E derivative; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; PMSF, phenylmethanesulphonylfluoride or phenylmethylsulphonyl fluoride; NaCl, sodium chloride; IC_{50} , 50% inhibitory concentration; H_2O_2 , hydrogen peroxide; RNS, reactive nitrogen species; Apaf-1, apoptotic protease activating factor 1.

* Corresponding author at: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900-Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: +55 48 3721 8057; fax: +55 48 37219542.

E-mail addresses: taniac@mbx1.ufsc.br, taniacbp@gmail.com (T.B. Creczynski-Pasa).

0009-2797/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cbi.2009.06.019

Please cite this article in press as: C. Locatelli, et al., Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death, Chem. Biol. Interact. (2009), doi:10.1016/j.cbi.2009.06.019

integrity. It has also been shown that perturbation of mitochondrial function is a key event in the apoptotic cascade [6]. Antitumoral agents may damage the mitochondria by increasing the permeability of the outer mitochondrial membrane or by promoting a collapse of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_{\text{mt}}$). A decline in $\Delta\psi_{\text{mt}}$ can disturb intracellular ATP synthesis, generate free radicals, alter the mitochondrial redox ratio, change intracellular pH, translocate cytochrome c to the cytoplasm, and degrade caspase-3/PARP [7].

The major redox-sensitive transcription factors in cells are NF- κ B, AP-1, and thioredoxin [3]. NF- κ B is activated by pro-oxidant conditions. During oxidative or nitrosative stress, the intracellular amount of GSH decreases and the amount of GSSG increases, which can be associated with the upregulation of γ -glutamylcysteine synthase (γ -GCS) expression [8] mediated by NF- κ B activation [9].

The melanoma adhesion molecule has been reported to be a membrane-bound glycoprotein that mediates cells adhesion. Cell adhesion molecules play a crucial role both in the interaction between vascular endothelium and circulating leukocytes and in subsequent cell extravasation [10]. Recently, soluble forms of VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin have been reported to be present in the supernatants of cytokine-activated cultured human EC and melanoma cell lines [11]. In particular, in patients with melanoma, an increase in ICAM-1 has been demonstrated to be related to the disease stage and is associated with a poor prognosis [10].

Gallic acid is an intermediate component of plant metabolism [12] and, together with its analogs, has been associated with a wide variety of biological actions. The biological activities described include antioxidant [13], antifungal [14], antibacterial [9], anti-malarial [14], and antiherpetic action [12]. However, the main interest in gallic acid and its derivatives is related to its antitumoral activity. It has been shown that lauryl, methyl and propyl gallate induce apoptosis in tumor cell lines and inhibit lymphocyte proliferation [15]. Other studies suggest that apoptosis induced by gallic acid and its analogs is associated with oxidative metabolism alterations, mitochondrial dysfunction, an increase in intracellular Ca^{2+} levels causing caspase activation [16,17], and DNA fragmentation [17]. However, the mechanism of apoptosis induction by gallic acid in tumoral cells is not well defined, though there is evidence that formation of free radicals is involved. Thus, the aim of this study was to investigate whether gallic acid and its derivatives (gallates) induce apoptosis in the B16F10 melanoma cell line via free radical generation. We focused on melanoma cells due to their relatively poor response to apoptotic stimuli and their high capacity to defend against oxidative stress [18].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The cell culture media, serum and antibiotics were purchased from GIBCO (São Paulo, Brazil), the luciferin–luciferase kit was purchased from Bio-Orbit® (Turku, Finland), the rabbit polyclonal NF- κ B p65 antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA, USA), and the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Molecular Probes), and all other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Rainbow markers and PVDF membranes were purchased from Amersham Biosciences (San Francisco, CA, USA). The compounds were synthesized and characterized as described elsewhere [19] and numbered according to the length of their carbon chains as follows: 0 (gallic acid) and 1–18 carbons (compounds with 9, 13, 15 and 17 carbons were not obtained). The compounds were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) (from Merck, Darmstadt, GE) and diluted in cell culture medium to a final concentration of 0.1%.

2.2. Cell culture

Murine B16F10 melanoma cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 10 mM HEPES (pH 7.4) at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Every 2–3 days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replacing it with fresh medium.

2.3. Viability assay

The cell incubations with the compounds were carried out for 24, 48 and 72 h with cell densities (cells/0.2 mL) of 8×10^4 , 4×10^4 , and 2×10^4 , respectively. Cell viability was monitored using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [20]. A control was run in parallel to monitor the influence of DMSO on the assays. The control cells with DMSO did not show any statistical differences from the control cells without it.

2.4. Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis

The isolation of apoptotic DNA fragments was based on the method of Han [21]. B16F10 cells (2×10^5 cells/well) were treated with the compounds for 24 h at concentrations of 20 and 100 μ M. The cells were then washed with cold PBS and incubated with lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris–HCl at pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 g/L proteinase K) at 50 °C for 2 h. The DNA was then precipitated with 2.5 V of ethanol at 25 °C overnight and dried by exposure to air. After washing with 70% ice-cold ethanol, the pellets were dissolved in TE buffer (10 mM Tris–HCl at pH 8.0, 1 mM EDTA and 0.6 g/mL RNase A) and further incubated at 37 °C for 1 h. Horizontal electrophoresis was performed at 200 V on a 1.5% agarose gel using TAE (Tris–acetic acid and EDTA) as the running buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized using a 2 UV transilluminator (MacroVue UV-20 Hoefer).

2.5. Cellular morphological observation

To observe changes in cellular morphology, the acridine orange (AO-Sigma)–ethidium bromide (BE-Sigma) staining method was performed [22]. B16F10 cells (5×10^3 cells/well) were plated into 96-well flat-bottom culture plates. After 24 h of incubation with two concentrations of the compounds (20 and 100 μ M), the cells were harvested using 0.125% trypsin and 0.01% EDTA, resuspended in 95 μ L of minimal essential medium, and incubated with 5 μ L of AO/BE staining solution (100 mg/L PBS of each dye) at room temperature for 15 min. Cells were examined using fluorescence microscopy and photographed (Olympus, Tokyo, Japan). Apoptosis was demonstrated by the appearance of cell shrinkage associated with condensation and fragmentation of the nuclei (viable cells were green in color with intact nuclei). Necrotic cells appeared orange with a normal nuclear structure. The percent of apoptotic cells was determined by counting 10 randomly selected high-power (200 \times) fields.

2.6. Determination of intracellular total glutathione, GSH and GSSG

Total glutathione (GSH + GSSG) was measured using the glutathione reductase method [23]. After 24 h of incubation (3×10^5 cells) with gallates at 0, 25, 50, and 75 μ M, the samples were washed twice with PBS. The cell lysates were prepared by adding 200 μ L of 12% TCA for protein precipitation. The cell lysates were centrifuged at 2000 \times g at 4 °C for 15 min. The supernatants of each sample were divided into two parts and were used to assay total

glutathione and GSH. One part of the supernatants was neutralized with NaOH 0.05 M and transferred to a 96-well plate. This was subsequently followed by the addition of a solution containing 75 μ M 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 120 μ M NADPH, 1 U/mL glutathione reductase (GR) and 10 mM EDTA in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4 for the determination of total glutathione levels. The absorbance was measured after 15 min at 412 nm using a Microwell Systems Reader (Organon Teknika). The other part of the sample supernatants was used for determination of GSH concentration. The samples were transferred to a 96-well plate, and this was followed by the addition of a solution containing 75 μ M 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 120 μ M NADPH, and 10 mM EDTA in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4. The absorbance was measured after 15 min at 412 nm using a Microwell Systems Reader (Organon Teknika). The concentrations of total glutathione and GSH were calculated using GSH as a standard and were normalized by cell number. The DTNB-enzyme recycling assay protocol for total glutathione and GSSG was performed according to method published previously [23]. The content of GSSG was calculated as follows: $\text{GSSG} = \text{total glutathione} - (\text{GSH}/2)$. GSSG is equivalent to 2 GSH according to the following reaction: $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ in the presence of GR [23]. Total glutathione content in the control cells was $2.381 \pm 0.280 \mu\text{M}/3 \times 10^5$ viable cells; GSH content in the control cells was $2.160 \pm 0.17 \mu\text{M}/3 \times 10^5$ viable cells; and GSSG content in the control cells was $0.11 \pm 0.05 \mu\text{M}/3 \times 10^5$ viable cells.

2.7. Determination of the cytosolic fraction of total glutathione

Total glutathione (GSH + GSSG) was also measured using the glutathione reductase method [23] after separation of the cytosolic fraction. After 24 h of incubation (3×10^5 cells) with gallates at 0, 25, 50, and 75 μ M, the samples were washed twice with PBS. The cells were then homogenized with Milli-Q water containing 1 mM EDTA. After that, the samples were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4°C to form a pellet. After the centrifugation, the pellets were discarded, and the supernatants were centrifuged again at $12,000 \times g$ for 15 min. After this centrifugation, the resulting pellets containing the mitochondrial and nuclei fraction were discarded. The supernatants were then centrifuged at $18,000 \times g$ for 20 min at 4°C . After centrifugation, the supernatant enriched with the cytosolic fraction and the pellet containing the endoplasmic reticulum fraction were separated. The pellets were discarded and the supernatants were immediately used for glutathione determination. An aliquot of 20 μ L of each homogenate was transferred to a 96-well plate and assayed as described in Section 2.6. The values were expressed as a percentage of the control value. The total glutathione concentration was calculated using GSH as a standard and was normalized per number of cells. The values were expressed in μM . The glutathione content of the control samples was $0.756 \pm 0.015 \mu\text{M}/3 \times 10^5$ viable cells.

2.8. Determination of the mitochondrial fraction of total glutathione

The mitochondrial fraction was obtained as described by Boitier et al. and Merad-Boudia et al. [24,25] with slight modifications. After the cells (3×10^5) were incubated for 24 h with gallates at concentrations of 0, 25, 50, and 75 μ M, the samples were washed twice with PBS. The cells were then homogenized in a buffer containing 10 mM Tris-HCl at pH 7.5 and 250 mM sucrose and incubated on ice for 15 min, then centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4°C . The pellets were discarded and the supernatants received a second centrifugation at $15,000 \times g$ for 15 min. After centrifugation, the supernatants containing the nuclei fraction were discarded and the pellets enriched with the mitochondrial fraction were

homogenized in a solution containing Milli-Q water and EDTA 1 mM, sonicated for 10 s, then centrifuged at $1500 \times g$ for 30 min. The supernatants were used for the determination of total mitochondrial glutathione content. The total glutathione content of the mitochondrial fraction (GSH + GSSG) was measured using the glutathione reductase method [23] as described in Section 2.6. The concentration of total glutathione was calculated using GSH as a standard and was normalized per number of cells. The glutathione content of the control samples was $1.657 \pm 0.026 \mu\text{M}/3 \times 10^5$ viable cells/0.2 mL.

2.9. γ -Glutamyl-cysteine synthetase (γ -GCS) activity

γ -GCS was assayed as described by Seeling and Meister [26] with slight modifications. First, 1×10^6 cells were incubated with gallates at concentrations of 25, 50, and 75 μ M for 12 h. The cell pellet was then lysed in a buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 8), 5 mM MgCl_2 , and 2 mM dithiothreitol and centrifuged at $12,500 \times g$ for 30 min. The supernatants were used for γ -GCS activity determination following NADH oxidation at 340 nm in a buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 8), 150 mM KCl, 5 mM $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 2 mM phosphoenolpyruvate, 10 mM L-glutamate, 10 mM L- α -aminobutyrate, 20 mM MgCl_2 , 2 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0.2 mM NADH, and 17 μ g of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase. The γ -GCS activity was monitored for 6 min. Data were expressed as nmol NADH $\text{mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

2.10. ATP measurement

The amount of intracellular ATP present in the cells was determined by a bioluminescence assay that measured the light output of the luciferin-luciferase reaction. To begin, 1×10^6 B16F10 cells were treated with different concentrations of the gallates for 24 h. The cell extracts were obtained by homogenization with 40 μ L of 1.25% trichloroacetic acid, then kept on ice for 30 min and neutralized with 20 μ L of 1 M Tris-acetate at pH 7.5. After centrifugation, the supernatants were diluted ($\times 4$) in the same buffer and used for ATP quantification following the manufacturer's protocol.

2.11. Free radical determination

Intracellular free radical formation was determined using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), which is oxidized to dichlorofluorescein (DCF). B16F10 cells were placed on 60 mm dishes (5×10^5 cells/dish) and incubated with 5 or 15 μ M of gallates in the absence or presence of 100 U/mL SOD (superoxide dismutase) or 50 μ M Trolox® (a water-soluble vitamin E derivative) for 12 h. The cells were then washed twice with PBS, incubated with 10 μ M DCFH-DA for 30 min at 37°C , and then washed four times with PBS. The DCF fluorescence signal was measured using a fluorescence microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) [7,27].

2.12. Cell adhesion assay

Each well of a 24-well plate was coated with 0.5 μ g fibronectin, blocked with 2% BSA for 1 h at 37°C and rinsed with 0.1% BSA [28]. The cells were then treated with varying concentrations of the gallates (0–75 μ M) for 12 h. Following incubation in ECM-coated wells for 1 h at 37°C , adhesive cells were stained with 0.2% crystal violet. Absorbance at 570 nm was measured to evaluate the number of adhesive cells in each well. The values were expressed as a percentage of the control values. The absorbance of the control was considered to be equivalent to 100% adhesion.

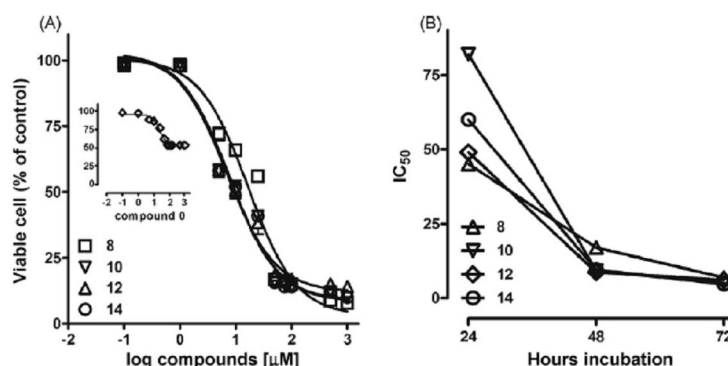


Fig. 1. Cytotoxicity of gallates in B16F10 cell. (A) Cell viability was assayed by MTT. Subconfluent B16F10 cells were left untreated or exposed to different concentrations of gallates for 48 h. Inset: results related to gallic acid. The results are expressed as the percentage of viable cells of drug-treated samples in comparison to control samples (100%). * $p < 0.05$. (B) IC₅₀ values plotted against time of incubation.

2.13. Preparation of nuclear extracts

Nuclear extracts were obtained as described previously [5]. Melanoma cell (5×10^6) were incubated with or without 25, 50, and 100 μ M gallates for 2 h. The cells were washed with PBS, dislodged using a cell scraper, and centrifuged at $300 \times g$ for 10 min. The cell pellets were resuspended in ice-cold cell lysis buffer (pH 7.9, containing 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5% NP-40 (v/v), and 0.5 mM PMSF along with 1 μ g/mL pepstatin, and 1 μ g/mL leupeptin). The samples were then centrifuged ($1810 \times g$) for 15 min at 4°C. Nuclear pellets were suspended in ice-cold buffer C (pH 7.9, containing 20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, and 1 mM dithiothreitol along with 1 μ g/mL pepstatin, 1 μ g/mL leupeptin, and 20% (v/v) glycerol) and then incubated for 30 min at 4°C. The extracted nuclei were centrifuged at $12,000 \times g$ for 30 min at 4°C and the supernatant was collected as nuclear extract. The total protein content was determined using the Bradford method [29].

2.14. Immunoblotting analysis

Nuclear lysates were denatured in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.001% bromophenol blue and heated in a boiling water bath for 3 min. Samples (30 μ g) were placed on a 12% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes. Rainbow markers were run in parallel. The PVDF membranes were blocked with Tween-TBS containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20, and 5% milk, and incubated overnight with rabbit polyclonal anti-NF- κ B antibody (1:1000 dilution with Tween-TBS). The membranes were then washed with Tween-TBS, followed by incubation (1 h) in the presence of biotin-conjugated (1:1000) anti-rabbit IgG and streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:1000) antibodies. Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine staining. The bands were quantified by densitometry using Scion Image Software (Scion Co, Frederick, Maryland, USA).

2.15. Statistical analysis

The results were presented as mean values (\pm SD) of triplicates from three independent experiments. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's t -test. p -Values less

than 0.05 were considered statistically significant. The evaluation of the correlation between total cellular glutathione content and γ -GCS activity was performed using Excel (version 3.0), and r^2 and t were obtained for each test condition.

3. Results

3.1. Cell toxicity

In order to screen and compare the cytotoxicity induced by the 14 ester gallic acid derivatives (gallates), the gallates (100 μ M) were incubated with B16F10 cells for 24 h. For the more active compounds, concentration-time-response curves were obtained. The concentrations of the compounds analyzed for the determination of IC₅₀ ranged from 0 to 500 μ M. For the other experiments, a maximum concentration of 100 μ M was used because values higher than that are not normally reached in plasma [30,31]. The cell death was evaluated after 24 (Fig. 1A), 48 and 72 h (not shown) to determine the IC₅₀. The IC₅₀ that was obtained was plotted against the three incubation times (Fig. 1B). Octyl gallate, decyl gallate, dodecyl gallate, and tetradecyl gallate demonstrated cytotoxicity with IC₅₀ values of 45, 82, 48, and 60 μ M, respectively, after 24 h of incubation; 16.5, 7.5, 7.0, and 8.0 μ M, respectively, after 48 h of incubation; and 7.0, 5.0, 6.0, and 4.7 μ M, respectively, after 72 h of incubation. Although the IC₅₀ values obtained after 72 h of incubation were lower, these results are not accurate because cells normally begin replicating after 48 h of incubation.

3.2. Characterization of cell death

In order to investigate whether or not the cell death was induced by apoptosis, the cells were incubated with gallates 0, 8, 10, 12, and 14 at 20 and 100 μ M for 24 h. After this incubation period, the cellular DNA was extracted and analyzed. As shown in the Fig. 2A and B, all compounds tested induced the internucleosomal breakdown of DNA and chromatin, resulting in ladder-like agarose electrophoretic patterns of the degraded DNA products. The ethidium bromide/acridine orange test (Fig. 2C and D) confirmed the results of the DNA fragmentation assay, i.e., it showed that all studied compounds induced cell death via apoptosis. The compound concentrations of 20 and 100 μ M were used in this assay because the IC₅₀ values of cell viability after 24 h of incubation with the four assayed compounds fell between these concentrations.

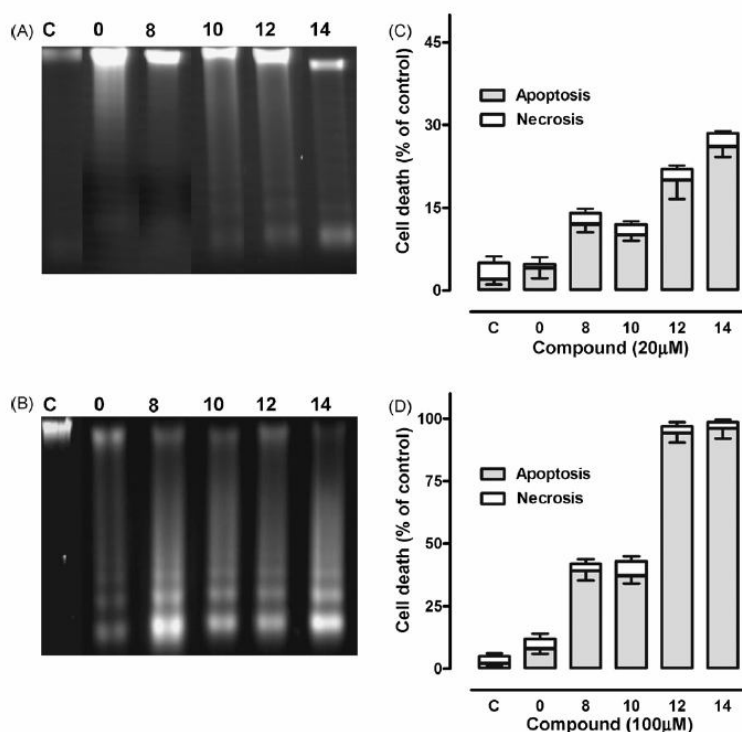


Fig. 2. Induction of apoptosis in B16F10 cells by gallates. The apoptosis was characterized by DNA fragmentation and ethidium bromide/acridine orange methods. The incubation time was 24 h. (A) DNA fragmentation after incubation with 20 μM and (B) 100 μM of the compounds. Part (C) represents the percentage of apoptosis/necrosis after cell incubation with the dyes and 20 μM and (D) 100 μM of the compounds for 24 h. For details see Section 2.

3.3. Free radical generation

To determine whether or not free radicals were also involved in gallate-induced cell death, cell viability in the presence of two

antioxidant free radical scavengers was evaluated. The cells were concomitantly incubated with varying concentrations of the gallate and 50 μM Trolox® or 100 U/mL SOD. As shown in Fig. 3, all compounds induced oxidative stress. Additionally, treatment with

Table 1

Effect of gallates on cellular, cytoplasmic fraction, and mitochondrial fraction glutathione contents and correlation between glutathione depletion and γ-GCS activity inhibition.

Comp	(μM)	GT cell (μM)	GT cyt (μM)	GT mit (μM)	GSSG total cell (μM)	GSH/GSSG	γ-GCS activity ^a	Correlation γ-GCS activity and GT cell
Cont	–	2.38 ± 0.28	0.76 ± 0.08	1.66 ± 0.33	0.11 ± 0.05	20	0.249 ± 0.02	
0	25	2.00 ± 0.16	0.73 ± 0.05	1.64 ± 0.28	0.07 ± 0.001	28	0.09 ± 0.01	$r^2 = 0.887$, Stat $t = 3.95$
	50	2.00 ± 0.23	0.68 ± 0.07	1.58 ± 0.16	0.05 ± 0.001	25	0.04 ± 0.01	
	75	2.00 ± 0.19	0.65 ± 0.05	1.57 ± 0.21	0.08 ± 0.001	22	0.002 ± 0.0001	
8	25	1.90 ± 0.21	0.74 ± 0.05	1.05 ± 0.34	0.48 ± 0.08	2	0.17 ± 0.01	$r^2 = 0.998$, Stat $t = 38.82$
	50	1.21 ± 0.14	0.71 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.28 ± 0.07	0.41	0.05 ± 0.008	
	75	0.99 ± 0.07	0.66 ± 0.05	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.03	1	0.001 ± 0.0001	
10	25	2.00 ± 0.22	0.75 ± 0.04	1.17 ± 0.16	0.75 ± 0.11	0.66	0.14 ± 0.07	$r^2 = 0.947$, Stat $t = 6.00$
	50	1.16 ± 0.13	0.74 ± 0.02	0.32 ± 0.06	0.39 ± 0.08	1.0	0.06 ± 0.008	
	75	0.88 ± 0.08	0.52 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03	1.16	0.001 ± 0.0001	
12	25	1.72 ± 0.24	0.75 ± 0.04	0.95 ± 0.11	0.61 ± 0.09	0.83	0.09 ± 0.006	$r^2 = 0.917$, Stat $t = 4.72$
	50	0.90 ± 0.11	0.58 ± 0.03	0.31 ± 0.07	0.28 ± 0.05	1.22	0.05 ± 0.007	
	75	0.59 ± 0.09	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.22 ± 0.06	0.68	0.002 ± 0.0001	
14	25	2.20 ± 0.25	0.66 ± 0.07	1.59 ± 0.17	0.93 ± 0.08	0.36	0.10 ± 0.04	$r^2 = 0.701$, Stat $t = 2.16$
	50	1.90 ± 0.23	0.59 ± 0.07	1.20 ± 0.15	0.77 ± 0.09	0.43	0.07 ± 0.002	
	75	0.95 ± 0.08	0.51 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.05	0.70	0.002 ± 0.0001	

GSH content is calculated as total glutathione – (2 × GSSG); the content of glutathione was calculated considering 100% of viable cell.

^a (μM NADH/mg protein/min); Comp: compound; Cont: control; GT cell: total cellular glutathione; GT cyt: total cytoplasmic fraction glutathione; GT mit: total mitochondrial fraction glutathione.

Please cite this article in press as: C. Locatelli, et al., Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death, Chem. Biol. Interact. (2009), doi:10.1016/j.cbi.2009.06.019

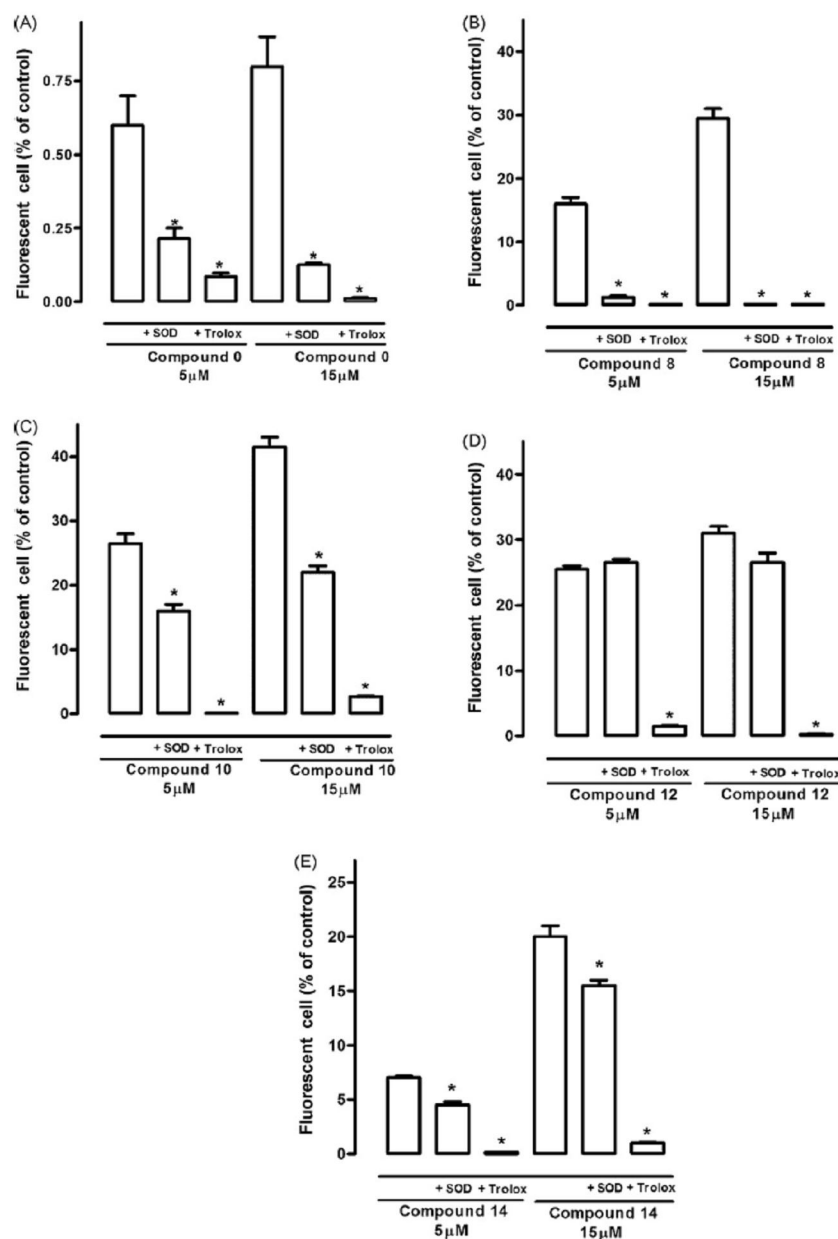


Fig. 3. Effects of antioxidants and gallates on free radical generation by B16F10 cells. Free radical formation was followed using DCFH-DA as described in Section 2. The compounds 0 and 8–14 (5 or 15 μM) (A–E) were added to the cells for 12 h in the absence or presence of SOD 100 U/mL or Trolox® 50 μM. The results are expressed as the percentage of fluorescent cells in comparison to control samples (zero % of fluorescence). **p* < 0.05.

SOD alone significantly blocked only the effects of the free radicals generated by compound 8. SOD treatment also prevented cell death in cells treated with compound 8 (results not shown). When these compounds were incubated with Trolox®, free radical formation was potently blocked (Fig. 3A–E). These findings suggest that all of the compounds that were tested produce oxidative stress. Although all compounds induced cell death through apoptosis, the

exact mechanism of cell death induction by each compound seems to differ.

3.4. Glutathione concentration and γ-GCS activity

As can be seen in Table 1, compounds 8, 10, 12, and 14 significantly decreased the total cellular glutathione content, as well as

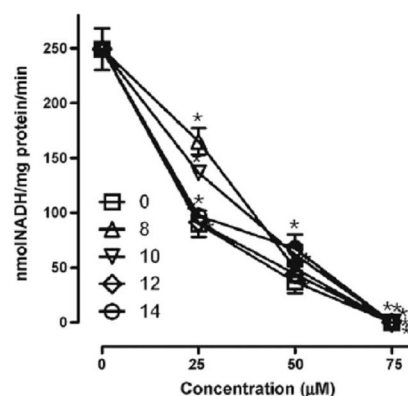


Fig. 4. Effect of gallates on γ -GCS activity. The B16F10 cells were incubated with the compounds for 12 h and then treated for spectrophotometric determinations of the enzyme activity as described in Section 2 ($n=5$). The samples were monitored for 6 min. The values were expressed as nmol NADH mg protein $^{-1}$ min $^{-1}$; * $p<0.05$.

the cytoplasmic and mitochondrial glutathione content, in treated cells. In addition to glutathione depletion, with the exception of compound 0, 24 h gallate treatment caused an increase in GSSG levels in melanoma cells to around 600% of that present in the controls. The ratio of GSH:GSSG was decreased to approximately 4.5% (mean values of compounds 8, 10, 12, and 14). The steady-state concentration of glutathione in the cell results from a balance between the rates of synthesis and loss of the tripeptide via oxidation or excretion. Under our experimental conditions, an increase in the intracellular free radical content was detected. Depletion of glutathione is supported by this evidence. However, the decrease in glutathione content induced by the compounds could also have occurred through inhibition of the key enzyme involved in glutathione synthesis (γ -GCS). In search of a mechanism that is responsible for the early change observed in glutathione content, we monitored the activity of this enzyme. In fact, the compounds inhibited γ -GCS activity (Fig. 4 and Table 1) by a maximum of 60% at 50 μ M. Table 1 shows a strong correlation between the depletion of cellular glutathione and the inhibition of γ -GCS activity for all compounds (8, 10, 12, 14) according to the parameters r^2 and $stat$. Compound 8 showed a particularly strong correlation.

3.5. Intracellular ATP content in B16F10 cells

ATP is the central parameter of cellular energy, metabolic regulation and cellular signaling; therefore, determination of the amount of intracellular ATP is important in the characterization of cellular physiology under stress induced by drug treatment. After incubation of the cells with 25 and 50 μ M of compounds 10, 12, and 14 (Fig. 5), the ATP content increased. However, the ATP content decreased significantly when compound concentrations were increased. Conversely, compound 8 promoted ATP depletion in a concentration-dependent manner.

3.6. Inhibitory effect of gallates on B16F10 cell adhesion

Tumor cell adhesion includes both the association of tumor cells with each other and with other types of cells. The adhesive ability of metastatic tumor cells is a critical factor in extravasation and the formation of new tumor foci [32]. After treating B16F10 cells with various concentrations of the compounds (0–75 μ M) for 12 h, all compounds inhibited the adhesion of B16F10 cells in

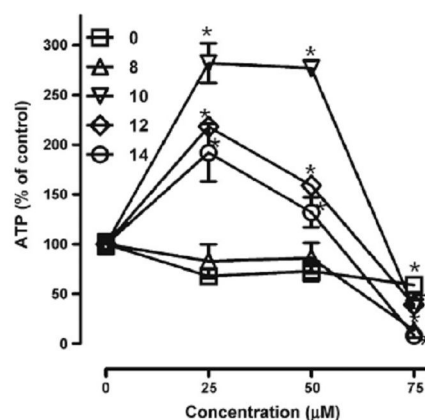


Fig. 5. Effect of gallates on B16F10 cells intracellular ATP content. ATP concentration was monitored by luciferin–luciferase method as described in Section 2 and presented as the percentage of the control. * $p<0.05$. The incubation time was 24 h.

a concentration-dependent manner. Compound 14 was the most potent in this challenge (Fig. 6).

3.7. NF- κ B activation

NF- κ B activation is an important intracellular pathway that enables drugs to induce free radical production. To assess whether NF- κ B p65 is involved in the mechanism of action of gallates, its activation was evaluated after 2 h of cell incubation. The results from the corresponding immunoblot are shown in Fig. 7. This figure indicates that compounds 10 and 12 induced a significant increase in peptide activation in a concentration-dependent manner. Compound 8 induced an increase only at 100 μ M, and compound 14 did not change the peptide activity.

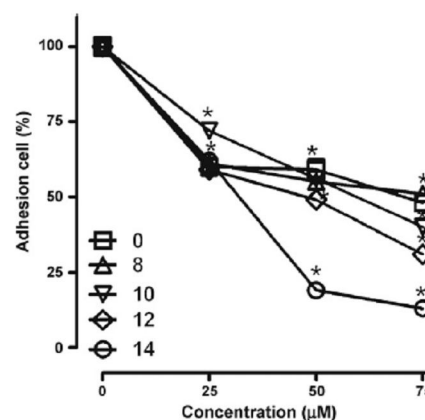


Fig. 6. Effect of gallates on the adhesive capability of B16F10 cells. The cells were incubated for 12 h with gallates and plated into micro-wells precoated with fibronectin. Crystal violet absorbance at 570 nm was collected to evaluate the relative number of adhesive cells. Values were normalized to the mean value of the control, which represents 100% of adhesion cell in 5×10^5 cells, and are presented as the mean \pm S.E.M percentage adhesion relative to the control ($n=3$). * $p<0.05$ compared to control group.

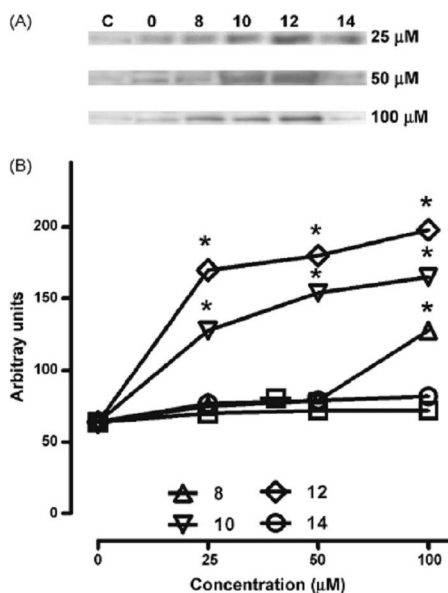


Fig. 7. Effect of gallates on NF-κB activation in B16F10 cells. After 2 h of incubation the samples were analyzed by immunoblotting as described in Section 2. The bands from the immunoblot (A) were quantified by densitometry using Scion Image Software and plotted (B), ($n = 3$).

4. Discussion

Many naturally occurring agents have shown chemoprotective potential in a variety of bioassay systems and animal models [33]. Phenolic compounds are reported to have antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic activity and are expected to reduce the risk of disease and to bring health benefits with daily intake [34]. Gallic acid and its derivatives show selective cytotoxicity toward a variety of tumor cells, with more cytotoxicity demonstrated towards tumor cells than non-tumor cells [35,36].

Our previous studies established that gallic acid and its derivatives show significant antioxidant, anti-herpetic, and antitumoral activity [19,37]. These compounds have demonstrated important activity against L1210 and CEM, murine and human lymphoblastic leukemia cell lines, respectively [37].

In the present study, we observed that gallic acid and its derivatives caused a significant increase ($p < 0.05$) in B16F10 cell death (Fig. 1) with relatively low IC_{50} values. This result is important because this cell line is particularly resistant to cell death. These cells have a high glutathione content, which accounts for this resistance to cell death, and a high metastatic activity [38].

The ladder-like agarose electrophoretic pattern of the DNA extracted from B16F10 cells after treatment with gallic acid and its derivatives (Fig. 2) indicates that the cell death occurred through apoptosis. Several studies have shown that gallic acid and lauryl gallate are efficient at the induction of apoptosis in different cancer cell lines, including breast cancer, lymphoma, leukemia, and colon carcinoma [4]. Apoptosis is an important phenomenon in cytotoxicity induced by anticancer drugs [7]. DNA is a target for many antitumor drugs that are currently used in clinical settings. However, there are only a few DNA-interactive agents that bind to DNA with high sequence selectivity. Induction of apoptosis in the metastatic tumor cell is considered a reasonable and promising chemopreventive and chemotherapeutic strategy [7,39]. There is previous evidence

demonstrating that gallic acid induces apoptosis in cells by the production of reactive oxygen species and that peroxide plays an important role in DNA fragmentation [40,41]. Recent studies have shown that several phenolic food antioxidant additives can accelerate the oxidative damage of biomolecules (including DNA) and that lauryl gallate is able to promote apoptosis by caspase-12. This caspase is related to endoplasmic reticulum stress [42].

Studies carried out by Serrano et al. [17] and Roy et al. [41] showed that lauryl gallate was able to induce apoptosis, to promote mitochondrial depolarization, to modify the affinity of protein tyrosine kinases (PTKs) for ATP and to induce glutathione depletion. Our results show that these compounds deplete cellular glutathione (both in the cytoplasm and mitochondria) (Table 1). It was also revealed that mitochondrial glutathione depletion occurs prior to the onset of apoptosis [2]. From the results showed here we can suggest that the capability of the gallates to induce apoptosis may either significantly be enhanced or reduced by modulation of intramitochondrial glutathione levels. When compounds 10, 11, 12 and 14 were tested in leukemia cells of the L1210 line, they seemed to promote apoptosis through glutathione depletion [37]. Benlloch et al. [38] suggest that the discovery of compounds able to maintain low glutathione levels in metastatic cells could represent a critical advance in cancer therapy, mainly because glutathione is involved in multiple drug resistance mechanisms in tumoral cells. The melanoma cells are able to adapt to low-level oxidative stress by inducing the expression and increasing the activity of important defense enzymes such as γ -GCS and catalase. [43,44]. Thus, some authors suggest that compounds able to promote glutathione depletion as well the inhibition of γ -GCS expression or activity could be an interesting strategy for cancer treatment [38,45]. Indeed, the gallates demonstrated considerable capability to promote the inhibition of γ -GCS activity (Fig. 4). Although the decrease in the amount total glutathione may be related to its efflux, one must consider the inhibition of γ -GCS activity to be important since there is a good correlation between the enzyme inhibition and the total glutathione amount. This result is very important because in situations of glutathione deprivation, the maintenance of the correct redox equilibrium in melanoma cells is greatly affected, causing them to be particularly vulnerable [46]. A decrease in the amount of glutathione and consequent cytochrome c release are early events in the apoptotic process because they precede the surface exposure of phosphatidylserine, an important signal that cells are in apoptosis [46]. Kim [47] showed that gallic acid can promote an nucleophilic attack to glutathione, decreasing its concentration and increasing the amount of glutathione–gallic acid adduct [47]. The pro-oxidant effects of these triphenols were confirmed by Muñoz-Munöz et al. [48], who showed that this activity can be involved with the mechanism of cell death induced by gallates.

Abnormal redox conditions in melanoma cells may provide a candidate target for therapeutic purposes. Free radical production and activation of caspase-9 and -3 occur later in the apoptotic process and appear to be a consequence of the redox imbalance [46]. Moreover, since elevated levels of glutathione have also been reported to play an important role in mediating tumor cell resistance to chemotherapy, the effect of gallates on glutathione cell content, which can contribute to increased drug susceptibility and γ -GCS activity inhibition, might be therapeutically useful. Such targets can be modulated specifically to reestablish the apoptotic pathway in cancer cells. A disturbance in the glutathione redox cycle may affect cellular free radical scavenging. In this regard, it was observed that the combination of gallates with Trolox® or SOD during the incubation of B16F10 cells reduced cell death (data not shown). Conversely, we also demonstrated that all compounds studied were able to promote free radical generation in the B16F10 cell line (Fig. 3) and that free radical formation was inhibited when compounds were incubated concomitantly with Trolox®. Among

the compounds studied here, only gallate 8 had a cytotoxic effect directly related to free radical generation. Several studies have shown that gallates with up to eight carbons in the alkyl chain (methyl, propyl, and octyl) can be absorbed, while gallates with more than 8 carbons (decyl, dodecyl) cannot [49]. The absorbed gallates are metabolized by intracellular esterases and promote free radical generation, while larger gallates induce apoptosis through other mechanisms, either by decreasing the of intracellular energy sources or by activating the extrinsic pathway of apoptosis [18,33]. Therefore, these compounds seem to have different mechanisms of action and should be investigated in relation to different kinds of cancer.

These findings also suggest that alterations in the intracellular redox balance (glutathione depletion and free radical generation) may be associated with induction of apoptosis by gallates. In fact, the involvement of redox reactions in the regulation of several key molecular mechanisms related to major cellular functions, such as cell proliferation, apoptosis, cell adhesion, and gene expression, has been documented [1]. Physiological concentrations of camptothecin, vinblastine, inostamycin, and adriamycin were found to generate hydrogen peroxide (H_2O_2) as a common event in apoptosis. This means that the generation of H_2O_2 is involved in apoptosis and is induced by various anticancer drugs, independent of their mechanism of action [40]. This free radical content increase is able to disturb the mitochondrial membrane by opening the pores, and, as a consequence, the release of cytochrome *c* is induced. Many agents are known to induce the release of cytochrome *c* by caspase 9 activation, glutathione depletion, and ROS hyperproduction, resulting in DNA fragmentation and apoptosis induction [40].

In this study, we demonstrated that gallates promote changes in the intracellular energy balance. Gallic acid and its derivatives that were investigated here showed the ability to promote alterations in the mitochondrial membrane potential, as observed through a modification in the content of ATP and mitochondrial glutathione. These alterations may be associated with free radical generation induced by gallates. It is well established that ROS and RNS are necessary as intermediates in various death processes [50]. Therefore, these results demonstrate that gallates induce apoptosis through free radical generation and alterations in the energy potential of the cell. The results in Fig. 5 show that the compounds modified the ATP content of the cells. Moreover, the apoptosis steps that are mediated by protein kinases are dependent on ATP, which acts as the phosphoryl donor for phosphorylation of some proteins involved in apoptosis [50]. In some cases, the increase in membrane potential and ATP concentration represents one of the initial steps of apoptosis. Conversely, a strong decrease in cellular ATP content usually occurs, triggering apoptosis [46].

Our investigations also showed that the transcription of NF- κ B is activated by gallates 10 and 12 in a concentration-dependent manner (Fig. 7), while gallate 8 induced activation of NF- κ B only at 100 μ M. NF- κ B was activated in cells after exposure to cytotoxic agents (including conditions of oxidative stress), to ligands of the surface cell death receptors such as tumor necrosis factor and Fas, and to genotoxic agents and chemotherapeutic drugs [51]. In many cases, NF- κ B activation mediates resistance to cell death or protection from apoptosis. Conversely, some studies have demonstrated that activation of NF- κ B is an important factor for the induction of Fas-mediated apoptosis [51]. NF- κ B activation promotes down-regulation of bcl-2, translocation of bax, and upregulation of p-53, inducing apoptosis in human aortic endothelial cells [51,52]. In relation to Fas activation, it has been reported that apoptosis induction by gallic acid in 3T3 pre-adipocytes occurs via the mitochondrial pathway [33].

Figs. 6 and 7 show that the mechanisms of cell death induced by gallates 8, 10, 12, and 14 are different. The mechanism of gallate 8 is possibly related to free radical generation; gallates 10 and 12 are

involved in NF- κ B activation; and gallate 14 is involved in the inhibition of cell adhesion. These different mechanisms of cell death induction may be associated with the differing levels of hydrophobicity associated with each compound. Studies carried out by Dodo et al. [42] and Locatelli et al. [37] indicated that the hydrophobicity of the alkyl chain of gallate derivatives is important in terms of antiproliferative activity, and the alkyl chain might contribute to improving the cell permeability or the interaction with hydrophobic pockets in the target molecule.

It is possible that the better cytotoxic effect of compound 14 is related to its ability to promote inhibition of cell adhesion. In view of the increase in cell adhesion molecules in the tumor of melanoma patients may be the principal evidence of treatment resistance, it might be expected that tumor cells expressing cell adhesion molecules would be especially good targets for new drugs [53].

Our study showed that in B16F10 melanoma cells, apoptosis seems to be promoted by an alteration in energy metabolism which is associated with free radical generation, mitochondrial glutathione depletion, NF- κ B activation, and inhibition of cell adhesion. As suggested in the literature, breaking the tolerance of melanoma cells for free radicals by impairing their antioxidant network holds future promise as an adjuvant therapy, particularly in a clinical setting in which melanoma cell apoptosis is induced by free-radical-producing therapeutics [43,54]. The mechanisms described in this report may have useful applications to improve metastatic melanoma therapy, and it would be of interest to study drug combinations such as a gallate and either cisplatin or doxorubicin. In our further investigations, we intend to analyze the possible interaction of gallates with the Fas receptor in the induction of apoptosis in B16F10 cells.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina) and a fellowship from Universidade do Contestado. This paper forms part of the doctoral studies of Claudiana Locatelli on the Pharmacy post-graduation course. The group wishes to thank the Hospital Universitário (HU) for the use of their facilities.

References

- [1] B. Gava, S. Zorzet, P. Spessotto, M. Cocchiello, G. Sava, Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium *trans*-imidazoledimethylsulfonate-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (1) (2006) 284–291.
- [2] S.M.K. Swamy, B.T.K. Huat, Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in α -hederin-induced apoptosis of P388 cells, *Mol. Cell Biochem.* 245 (2003) 127–139.
- [3] F.L. Meyskens Jr., H.V. Chau, N. Tohidian, J.A. Buckmeier, Luminol-enhanced chemiluminescent response of human melanocytes and melanoma cells to hydrogen peroxide stress, *Pigment Cell Res.* 10 (1997) 184–189.
- [4] Z. Lu, G. Nie, P.S. Belton, H. Tang, B. Zhao, Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives, *Neurochem. Int.* 48 (2006) 263–274.
- [5] P. Constantin, A.S. Belzacq, H.L. Vieira, N. Larochette, M.A. Pablo, N. Zamzami, et al., Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2 independent permeability transition pore opening and apoptosis, *Oncogene* 19 (2000) 307–314.
- [6] R.S. Balaban, Modeling mitochondrial function, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 291 (2006) c1107–c1113.
- [7] W.P. Hu, H.S. Yu, P.J. Sung, F.Y. Tsai, Y.K. Shen, L.S. Chang, et al., DC-81-Indole conjugate agent induces mitochondria mediated apoptosis in human melanoma A375 cells, *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 905–912.

- [8] I. Rahman, W. MacNee, Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1405–1420.
- [9] S.K. Manna, M.T. Kuo, Overexpression of γ -glutamylcysteine synthetase suppresses tumor necrosis factor induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor κ B and activator protein 1, *Oncogene* 18 (1999) 4371–4382.
- [10] S. Yoshioka, H. Fujiwara, T. Higuchi, S. Yamada, M. Maeda, S. Fujii, Melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) is expressed on human luteinizing granulosa cells: enhancement of its expression by hCG, interleukin-1 and tumour necrosis factor- α , *Mol. Hum. Reprod.* 9 (6) (2003) 311–319.
- [11] C. Fortis, L. Galli, G. Consogno, G. Citterio, P. Matteucci, U. Scaglietti, E. Bucchi, Serum levels of soluble cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) and of cytokine TNF- α increase during interleukin-2 therapy, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76 (2) (1995) 142–147.
- [12] S.M. Fiuza, C. Gomes, L.J. Teixeira, M.T. Girão da Cruz, M.N.D. Cordeiro, N. Milhazes, et al., Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3581–3589.
- [13] P. Grundhofer, R. Niemetz, G. Schilling, G.G. Gross, Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins, *Phytochemistry* 57 (2001) 915–927.
- [14] E. Klein, N.J. Weber, In vitro test for the effectiveness of antioxidants as inhibitors of thyl radical-induced reactions with unsaturated fatty acids, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1224–1227.
- [15] A. Mahadevan, M.K. Reddy, Effect of phenolic compounds on growth, polygalacturonase production, and activity of *Fusarium oxysporum*, *J. Plant Pathol.* 74 (1968) 87–90.
- [16] N. Isayama, K. Okazoe, N. Ichimura, Y. Sugihara, T. Kono, Synthesis of antitriphosphol drugs derived from gallic acid, *Nichidai Igaku Zasshi* 27 (1968) 270–272.
- [17] A. Serrano, C. Palacios, G. Roy, C. Cespon, M.L. Villar, M. Nocito, et al., Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation, *Arch. Biochem. Biophys.* 350 (1) (1998) 49–54.
- [18] J. Kluz, A. Lansiaux, N. Wattez, M.P. Hildebrand, S. Léonce, A. Pierré, et al., Induction of apoptosis in HL-60 leukemia and B16 melanoma cells by the acronyline derivative 523906-1, *Biochem. Pharmacol.* 63 (8) (2002) 1443–1452.
- [19] L.A. Savi, P.C. Leal, T.O. Vieira, R. Rosso, R.J. Nunes, R.A. Yunes, et al., Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects the synthetic alkyl-esters of gallic acid, *Arzneimittelforschung* 55 (2005) 66–75.
- [20] A.A. Van De Loosdrecht, E. Nennie, G.J. Ossenkoppele, R.H. Beelen, M.M. Langenhuijsen, Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study, *J. Immunol. Methods* 141 (1) (1991) 15–22.
- [21] R. Han, Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques, Pekin Medical University, Pekin Union Medical College Joint Publishing House, Beijing, 1997.
- [22] M. Leite, M. Quinta-Costa, P.S. Leite, J.E. Guimarães, Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death—study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60, *Anal. Cell Pathol.* 19 (3–4) (1999) 139–151.
- [23] F. Tietze, Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Anal. Biochem.* 27 (1969) 502–522.
- [24] E. Boitier, M. Merad-Boudia, C. Guguen-Guillouzo, N. Defer, I. Ceballos-Picot, J.P. Leroux, C. Marsac, Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radical, *Cancer Res.* 55 (1995) 3028–3035.
- [25] M. Merad-Boudia, A. Nicole, D. Santiard-Baron, C. Saillé, I. Ceballos-Picot, Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease, *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998) 645–655.
- [26] G.F. Seeling, A. Meister, Glutathione biosynthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 379–390.
- [27] D.S. Kim, S.Y. Kim, Y.M. Jeong, A.E. Jeon, M.K. Kim, Light-activated indole-3-acetic acid induces apoptosis in G361 human melanoma cells, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (12) (2006) 2404–2409.
- [28] S. Hiscox, M.B. Hallet, M.C.A. Puntis, W.G. Jiang, Inhibition of cancer cell motility and invasion by interleukin-12, *Clin. Exp. Metastasis* 13 (1995) 396–404.
- [29] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [30] P. Cos, M. Calomme, J.B. Sindambiwe, T. De Bruyne, K. Cimanga, L. Pieters, et al., Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids, *Planta Med.* 67 (6) (2001) 515–519.
- [31] P. Cos, P. Rajan, I. Vedernikova, M. Calomme, L. Pieters, A.J. Vlietinck, et al., In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives, *Free Radic. Res.* 36 (6) (2002) 711–716.
- [32] N.A. Walter, J. Stebbing, W. Messier, The potential significance of adaptive evolution and dimerization in chimpanzee intercellular cell adhesion molecules (ICAMs), *J. Theor. Biol.* 232 (3) (2005) 339–346.
- [33] C.L. Hsu, W.H. Lo, G.C. Yen, Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7359–7365.
- [34] G. Galati, P.J. O'Brien, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 287–303.
- [35] Y. Ohno, K. Fukuda, G. Takemura, M. Toyota, M. Watabe, N. Yasuda, et al., Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells, *Anticancer Drugs* 10 (1999) 845–851.
- [36] K. Yoshioka, T. Kataoka, T. Hayashi, M. Hasegawa, Y. Ishi, H. Hibasami, Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines, *Oncol. Rep.* 6 (2000) 1221–1223.
- [37] C. Locatelli, R. Rosso, M.C. Santos-Silva, A.C. Souza, M.A. Licinio, P. Leal, et al., Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 3791–3799.
- [38] M. Benlloch, A. Ortega, P. Ferrer, R. Segarra, E. Obrador, M. Asensi, et al., Acceleration of glutathione efflux and inhibition of γ -glutamyltranspeptidase sensitization B16 melanoma cells to endothelium induced cytotoxicity, *J. Biol. Chem.* 280 (8) (2005) 6950–6959.
- [39] H.S. Jun, T. Park, C.K. Lee, M.K. Kang, M.S. Park, H.I. Kang, Y.J. Surh, O.H. Kim, Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of Bcl-2, *Food Chem. Toxicol.* 45 (5) (2007) 708–715.
- [40] M. Inoue, N. Sakaguchi, K. Isuzugawa, T. Hiroyuki, Y. Oghara, Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis, *Biol. Pharm. Bull.* 23 (10) (2000) 1153–1157.
- [41] G. Roy, M. Lombardía, C. Palacios, A. Serrano, C. Céspon, E. Ortega, et al., Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by lauryl gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231, *Arch. Biochem. Biophys.* 338 (2) (2000) 206–214.
- [42] K. Dodo, T. Minato, T. Noguchi-Yachide, M. Suganuma, Y. Hashimoto, Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (–)-epigallocatechin gallate, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (17) (2008) 7975–7982.
- [43] C. Giommarelli, A. Corti, R. Supino, E. Favini, A. Paolicchi, A. Pompella, F. Zunino, Cellular response to oxidative stress and ascorbic acid in melanoma cells overexpressing γ -glutamyltransferase, *Eur. J. Cancer* 44 (2008) 750–759.
- [44] C. Giommarelli, A. Corti, R. Supino, E. Favini, A. Paolicchi, A. Pompella, F. Zunino, γ -Glutamyltransferase-dependent resistance to arsenic trioxide in melanoma cells and cellular sensitization by ascorbic acid, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (11) (2009) 1516–1526.
- [45] A. Ortega, P. Ferrer, J. Carretero, E. Obrador, M. Asensi, J.A. Pellicer, et al., Down-regulation of glutathione and Bcl-2 synthesis in mouse B16 melanoma cells avoids their survival during interaction with the vascular endothelium, *J. Biol. Chem.* 278 (41) (2003) 39591–39599.
- [46] A. Biroccio, B. Benassi, G. Filomeni, S. Amodei, S. Marchini, G. Chiorino, et al., Glutathione influences c-Myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 277 (46) (2002) 43763–43770.
- [47] Y.J. Kim, Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (6) (2007) 1052–1055.
- [48] J.L. Muñoz-Muñoz, F. García-Molina, P.A. García-Ruiz, E. Arribas, J. Tudela, F. García-Canoas, J.N. Rodríguez-Lopez, Enzymatic and chemical oxidation of trihydroxylated phenols, *Food Chem.* 113 (2009) 435–444.
- [49] P. Tammela, L. Laitinen, A. Galkin, T. Wennberg, R. Heczek, H. Vuorela, et al., Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in CaCo-2 cells and in phospholipid vesicles, *Arch. Biochem. Biophys.* 425 (2004) 193–199.
- [50] V.P. Skulachev, Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis, *Apoptosis* 11 (2006) 473–485.
- [51] X. Bian, L.M. McAllister-Lucas, F. Shao, K.R. Schumacher, Z. Feng, A.G. Porter, et al., NF- κ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells, *J. Biol. Chem.* 276 (52) (2001) 48921–48929.
- [52] S. Shishodia, B.B. Aggarwal, Nuclear factor- κ B: a friend or a foe in cancer? *Biochem. Pharmacol.* 68 (6) (2004) 1071–1080.
- [53] J.P. Johnson, Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma, *Cancer Metastasis Rev.* 18 (1999) 345–357.
- [54] H.G.M. Wittgen, L.C.L.T. Van Kempen, Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications, *Melanoma Res.* 17 (2007) 400–409.

3.1.2 ESTUDOS *IN VIVO*

3.1.2.1 Efeito Antimetastático e inibição da expressão de moléculas de adesão do tetradecil galato.

3.1.2.2 Artigo 3

**Antimetastatic potential and low systemic toxicity of tetradecyl
gallate, a gallic acid derivate**

Locatelli C., Carvalho D.R., Mascarello A., Yunes R.A., Nunes R. J.,
Pilatti C., Creczynski-Pasa T.B.

Submetido para European Journal of Pharmaceutical Science

In vitro and in vivo antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate.

Claudiana Locatelli^{a,b}, Deborah Regina de Carvalho^b, Alessandra Mascarello^c, Rosendo A. Yunes^c, Ricardo J. Nunes^c, Celso Pilatti^d, Tânia Beatriz Creczynski – Pasa^{a,*}.

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, CP 476 Florianópolis, SC, Brazil

^b Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, Campus Caçador, 89500-000 Caçador, SC, Brazil

^c Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, CP 476 Florianópolis, SC, Brazil

^d Departamento de Patologia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Campus Universitário de Lages, Lages, SC, Brazil

* Corresponding author. Tel: + 55 48 3331 8057; fax: + 55 48 33319542; e-mail: taniac@mbox1.ufsc.br

Abstract

Melanoma is commonly associated with multiorgan metastasis, and lung is a frequent metastatic site for melanoma. However, the mechanism responsible for such melanoma-induced lung is still poorly understood. In the present study the pulmonary antimetastatic activity and the systemic toxicity of tetradecylgallate (C_{14}) were evaluated. The ability of C_{14} to inhibit the lung metastasis was verified using an experimental mouse model obtained by intravenous injection of metastatic B16F10 melanoma cells. The C_{14} was given intraperitoneally at a dose of 3.7 mg/Kg with intervals of three days for 28 days. The systemic toxicity of C_{14} for the animals was evaluated by weight measurements, survival, hematological parameters, biochemical and histological analyses. It was observed during the *in vitro* assays that C_{14} induced cytotoxic effects and the IC_{50} values obtained were around 10 μ M after 48 h of incubation. The C_{14} was able to induce significant decrease in cell adhesion and inhibition of ICAM-1 and VCAM-1 expression. In the *in vivo* assays C_{14} decreased lung metastases. Additionally, the administration of C_{14} increased the survival rate of animal without causing apparent collateral effects. These findings are important since the melanoma cells are resistant to death and show high adhesion power and propensity to metastasize.

Keywords: melanoma, antimetastatic, cell adhesion, antitumoral, gallic acid derivative.

1. Introduction

Malignant melanoma is a lethal disease, its incidence and mortality are increasing worldwide and, only in the last two decades, this number has grown three-fold, with annual increase rate of 3 to 7% (Maruta et al., 2008; Flores et al., 2008). The metastasis represents the principal reason of mortality for melanoma.

Cell adhesion molecules, belonging to the integrin, cadherin and immunoglobulin superfamilies have been implicated in tumor progression in cutaneous melanoma and consequently with high incidence of metastasis. Cell adhesion molecule in melanoma is an independent factor for the risk of metastasis with a predictive value superior to that of tumor thickness (Ebrahimnejad et al., 2004; Haas, 2005).

Expression of two types of cell adhesion molecules are associated with poor prognostic in melanoma; VCAM-1 mediates interaction with vascular endothelium and ICAM-1 is associated with primary tumors that mediate interaction with leukocytes but also can act as receptors for integrins and extracellular matrix proteins (Johnson, 1999). These cell adhesion molecules are good therapeutic targets for melanoma treatment.

The conventional chemotherapy is often accompanied by serious side effects, such as myelosuppression, hepatic injury, kidney toxicity and nausea, leading to the abandonment of the treatment. In the past decade, some other new cytotoxic drugs have come into clinic application. Despite of the progress, chemotherapy has not satisfied the expectation of complete responses to the therapy in patients or achieved cures in patients with advanced-stage cancer (Bai et al., 2009).

Gallic acid and other polyphenolic substances are able to inhibit the growth of cells from several types of tumor (Saleem et al., 2002; Zhang et al., 2008). Hydroxibenzoic acids, such as gallic acid and ellagic acids, cause apoptosis in human DU-145 prostate cancer and HL-60 cells (Veluri et al., 2006; Lansky and Newman, 2007) and isobutyl gallate-3,5-dimethyl ether and methyl gallate-3,5-dimethyl ether showed important chemotherapeutic potential toward Ehrlich ascites tumor and lung cancer cells LLC1.

In previous studies we demonstrated that gallic acid derivatives induce apoptosis in leukemia and melanoma cells (Locatelli et al., 2008; Locatelli et al., 2009). Among several gallic acid derivatives dodecyl and tetradecyl gallate showed to be more potent. These gallates present high lipophilicity probably being the reason for their higher cytotoxic effects by interacting better with the cell targets. The gallate C₁₄ in a previous study showed low toxicity for rat hepatic tissue (Rosso et al., 2006). From toxicological studies it was observed that the “no-observed-adverse-effect-level” (NOAEL) of gallic acid is at least 120 mg / kg / day for rats and the NOAEL for derivatives was reported to be much higher (1000 mg / kg / day) for mice (Van der Heijden and Janssen, 1986; Lu et al., 2006). The low toxicity of C₁₄ is important since the conventional chemotherapy is often accompanied by serious side effects.

Since antimetastatic activity of tetradecyl gallate has not yet been described in the literature, the present study attempts to shed light on this matter.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The cell culture media, serum and antibiotics were purchased from GIBCO (São Paulo, Brazil), rabbit polyclonal ICAM-1 and VCAM-1 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA) and all other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Rainbow markers and nitrocellulose membranes were purchased from Hybond-P, Amersham Biosciences, San Francisco, CA. The tetradecyl gallate was synthesized and characterized as described elsewhere (Savi et al, 2005) and numbered according to the size of the carbon chain (14 carbons). The compound was dissolved in 100% of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Darmstadt, GE) and diluted in cell culture medium to a final concentration of 0.1 % of the solvent. The gallate used (tetradecyl gallate named C₁₄) in *in vivo* experiments was diluted in 100 % DMSO and further diluted in PBS to a final concentration of 2 % DMSO for injection. The control group received vehicle (DMSO 2 % in PBS, without gallate).

2.2 Cells

B16F10 mouse epithelial-like melanoma cell line was acquired from ATCC, Manassas, VA. The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10 mM HEPES (pH 7.4). Every 2 - 3 days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replacing it with fresh medium. The cells were cultured in a

humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37° C, and then harvested with trypsin:EDTA (0.05:0.03 w/v) solution, washed and inoculated in the animals in PBS (pH 7.4).

2.3 Cytotoxic activity assay

The cell line B16F10 was incubated for 24, 48 and 72 h in 96-microwell plates (at a concentration of 8×10^4 , 4×10^4 and 2×10^4 cells/0.2 mL, respectively) with C₁₄. The compound was dissolved in DMSO and added to the cell culture. The final DMSO concentration was 0.1% and the negative control received only 0.1 % DMSO. A control run in parallel to monitor the influence of DMSO in the assays. The control with solvent did not show statistical differences from the control cells alone. After incubation, cell viability was determined with or without C₁₄, using the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Van De Loosdrecht et al., 1991). This assessment of cytotoxic activity is based on the capability of living cells to reduce the yellow product MTT to a blue product, formazan. After 2 h of incubation with MTT the medium was removed and acidified isopropanol (0.04 mol/L HCl) was added. The number of living cells is directly proportional to the intensity of the blue, which is quantitatively measured by a microplate reader at 570 nm wavelength. Cell viability was expressed as a percentage of control cells which corresponds to 100 % of viability for each condition tested, and n = 3.

2.4 Cell adhesion assay

Each well of a 24-well plate was coated with 0.5 μ g fibronectin, blocked with 2% BSA for 1 h at 37° C and rinsed with 0.1% BSA (Hiscox, 1995). The cells were then treated varying the concentrations of the gallate (0 - 75 μ M) for 12 h. Following with incubation in ECM-coated wells for 1 h at 37°C, adhesive cells were stained with 0.2 % Crystal Violet. Absorbance at 570 nm was measured to evaluate the number of adhesive cells in each well. The values were expressed as a percentage of the control values. The absorbance of the control corresponds to 100 % of cell adhesion.

2.5 Preparation of cell extracts

B16F10 mouse melanoma cells were incubated with C₁₄ at concentrations 0, 10, 25 and 75 μ M, for 12 h. Adhesive cells were washed with PBS and lysed in 500 μ l of lyses buffer (50 mM HEPES pH 7.0), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, 0.5 mM sodium orthovanadate, 10 mg/mL *p*-nitrophenylphosphate, 10 μ g/mL aprotinin, 20 μ g/mL leupeptin, 1 mM PMSF and 0.02 % NaN₃). Lysates were collected, centrifuged and stored at – 20° C for Western blot analysis (Kornberg et al., 1992). The protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford, 1976).

2.6 Western Blot Analysis

Cell lysates (50 µg of protein) were resolved by 12 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose using a semidry transblot apparatus. The membranes were incubated for 1 h in blocking buffer (Tween-TBS containing 20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1 % Tween-20 and milk 5 %) and further incubated overnight in the presence of the primary antibody (1:1000 dilution with Tween-TBS). The membranes were then washed with Tween-TBS, followed by incubation (1 h) with goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Dianova, Hamburg, Germany) in Tween-TBS. The membranes were then washed in TBS and the bound antibody was visualized with the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2.7 Drug and Animals

The gallate was dissolved in 100 % DMSO and diluted in PBS at a final concentration of 2 % DMSO for injection in each animal. The mice used in this study were maintained under specific pathogen-free conditions. The animals were housed in laminar-flow cages maintained at a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a relative humidity of 50-60 %, under a 12:12 h light-dark cycle. The animals were kept under these conditions for at least one week before the experimental.

Swiss female mice, 6-8 weeks old, were matched for body weight (20 to 25 g). The experiments with animals were performed in accordance with ethical guidelines of Helsinki Declaration (1975), and were previously approved by the University's Ethics Committee for Animal Use on the Principles of Animal Care.

2.8 Experimental Lung Metastasis Assay In Vivo

The highly metastatic tumor variant B16F10 melanoma was used to induce metastasis. B16F10 melanoma cells (1×10^6 cells in 0.1 ml) were injected via the lateral tail vein of the animals. After B16F10 inoculation the animals were then divided in three groups, each containing ten individual. The negative control and received only the vehicle (2 % DMSO in PBS), while the positive control received both the cells and the vehicle and the third group received the cells and the solution of C₁₄ (3.7 mg/Kg body weight), the solutions corresponding for each group were administrated intraperitoneally every three days during 28 days. At the final day of the treatment the animals were anesthetized and the blood was collected by intraorbital vein in heparinized propylene tubes for biochemical analysis. After that the animals were killed and all organs excised for histopathology and biochemical analysis. The organs were fixed with a 10% formaldehyde solution and evaluated.

2.9 Toxicity Observation

Drug toxicity indexes such as weight loss, ruffled fur, behavior change and feeding patterns were continuously observed during the whole treatment.

To clarify potential side effects in the treated mice, the tissues of heart, liver, spleen, lung, and kidney were processed according to histopathology assay protocol, and blood was collected and assayed to evaluate hepatic and renal toxicity. The non-protein thiol and TBARS levels determination were assayed in lung and liver to investigate the possible oxidative damage induced by gallate.

2.10 Hepatic and renal evaluation

The blood samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min at room temperature and the serum was separated and used for the estimation of aspartate and alanine transaminase activities (AST and ALT respectively) for hepatic evaluation. Renal function was analyzed by determining serum urea and creatinine. The biochemical assays were done using a Johnson & Johnson: Vitros 750 XRC chemistry analyzer.

2.11 Non-protein thiol determination

Non-protein thiol (NPSH) groups were determined as described by Ellman (1959). The tissue fraction was obtained after homogenization in 1 volume of 12 % trichloroacetic acid followed by centrifugation. An aliquot of the supernatant was added to phosphate buffer (at final concentration of 800 mmol/l at pH 7.4) and 500 μ mol/ DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid). The color development resulting from the reaction between DTNB and thiols reached the maximum in 5 min and remained stable for more than 30 min. To calculate the

NPSH groups in the tissue samples, a standard curve using glutathione was made in parallel.

2.12 Determination of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels

TBARS were determined in the supernatant by the method of Ohkawa et al. (1979), in which malondialdehyde, an end-product of fatty acid peroxidation reacts with thiobarbituric acid to form a colored complex. Briefly, samples were incubated at 100° C for 60 min in a medium containing 0.45 % sodium dodecyl sulfate, 100 mM hydrochloric acid, 1.4 M acetic acid, at pH 3.4 and 0.6 % thiobarbituric acid. After centrifugation the reaction product was determined at 532 nm.

2.13 Histopathology

The tissues were processed by standard histopathological techniques. The tissue sections were cut at 5-8 µm thickness with a rotary microtome at room temperature and were fixed in a 10 % neutral phosphate-buffered formalin solution for histopathological analysis. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E) and observed by pathologist in a blinded manner. Tissue sections were observed in a microscope at a magnification of 400 X.

2.14 Effect of tetradecyl gallate in the survival rate of metastatic tumor bearing animals

Groups of ten Swiss female mice were injected with B16F10 melanoma cells (1×10^6 cell in 0.1 mL) in the lateral tail vein. Drug administration was done as described in the previous experiment. The mortality of animals was noted and the percentage increase in life span (%ILS) was calculated from the formula $\% \text{ ILS} = [(T - C) / C] \times 100$ where T is the number of days that the treated animals survived, and C the number of days that control animals survived.

2.15 Statistical analysis

The data were expressed as means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test when appropriated. The Pearson's correlations (r , P) in each tissue were calculated by associations among all dependent variables. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The experiments were repeated twice.

3. Results

3.1 *In vitro* assays

3.1.1 Cytotoxicity of C₁₄

The Fig. 1 shows that C₁₄ exhibited very strong cytotoxicity with IC₅₀ value of approximately 10 μ M after 48 h of incubation. In 24 h of incubation the C₁₄ also showed important cytotoxic effect and at 100 μ M 80 % of melanoma cell went to death, with IC₅₀ of 60 μ M. Although the IC₅₀ values obtained after 72 h of incubation were lower, these results are shown just as a curiosity, because as this cell line normally start to duplicate after 48 h of incubation, the results are not accurate.

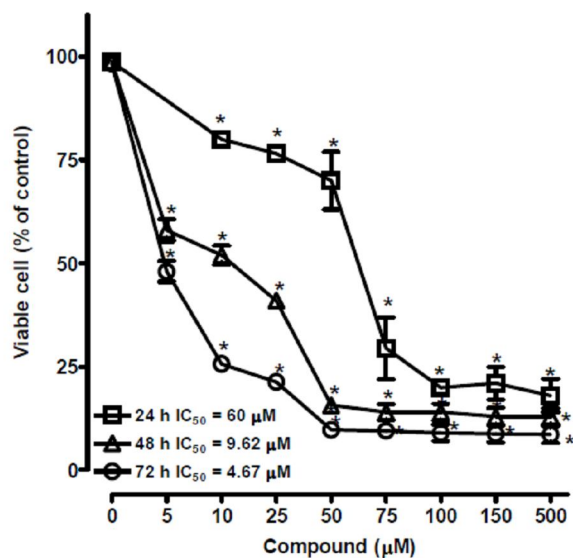


Fig. 1. Cytotoxicity of C₁₄ toward B16F10 cell. Cell viability was assayed by MTT. Subconfluent B16F10 were exposed to different concentrations of C₁₄ for 24, 48 and 72 h. The results are expressed as the percentage of viable cells of drug-treated samples in comparison to control samples (100 %). * $p < 0.05$. (B) IC₅₀ values plotted against time of incubation.

3.1.2 Effect of C_{14} on cell adhesion and ICAM-1 and VCAM-1 expression in B16F10 melanoma cell

Adhesion was assayed in cell cultures exposed to 0 - 100 μ M C_{14} for 12 h. C_{14} showed concentration-dependent inhibitory effect on the B16F10 cells adhesion (Fig. 2). The concentration of C_{14} inhibiting 50 % of cell adhesion (IC_{50}) was around 32 μ M. After treatment with C_{14} the maximum inhibition was obtained at 100 μ M for 12 h. No further effect was observed after incubation with 500 μ M (data not shown). The adhesion of tumor cells includes the conjunction of tumor cells themselves as well as the cells surround the specific tissue. Adhesive ability of metastatic tumor cells is a critical factor in extravasations and formation of new tumor foci.

Melanoma cells show high potential in adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 expression. The Fig. 3 (A - B) shows a significant inhibition of ICAM -1 (3A) and VCAM -1 (3B) expression in B16F10 cells by C_{14} at 75 μ M after 12 h of incubation. Dacarbazine (DC) a formal antitumoral drug was not able to inhibit such molecules expression at 200 μ M after 12 h of incubation.

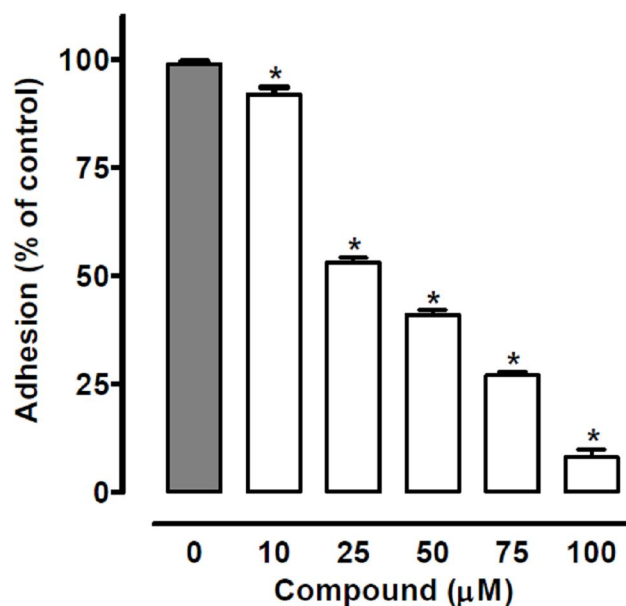


Fig. 2. Effect of C_{14} on the adhesive capability of B16F10 cells.. The cells were treated for 12 h with 0 – 100 μM of C_{14} , then resuspended in a medium containing 0.1 % BSA and plated into micro-wells precoated with fibronectin. The staining was done with 0.2 % Crystal Violet and the absorbance at 570 nm was evaluated to determine the relative number of adhesive cells. Values were normalized to the mean value of the control, which represent 100 % of adhesion cell in 5×10^5 cells and are presented as the mean \pm S.E.M percentage adhesion relative to the control ($n = 3$). * $p < 0.05$ compared to control group.

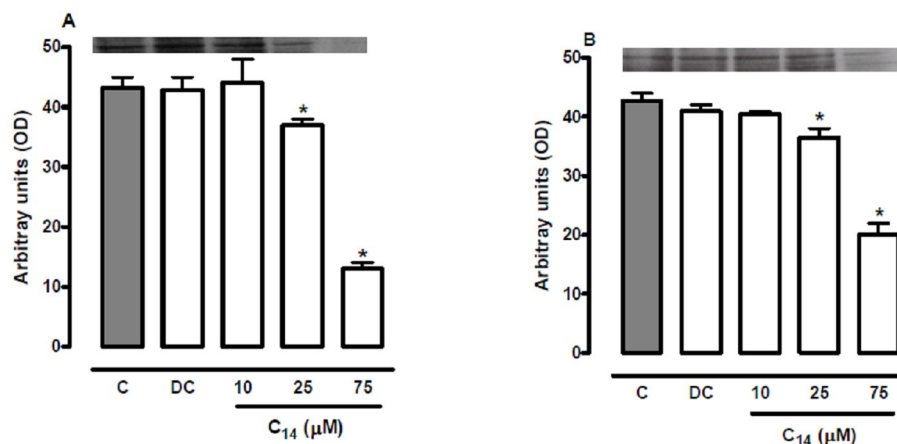


Fig. 3. Inhibitory effect of C₁₄ on protein expression of ICAM-1(A) and VCAM-1 (B). After treatment of B16F10 cells with C₁₄ (10 – 75 μM) or 200 μM dacarbazine (DC) for 12 h, the protein amount was extracted and assessed by Western blot. A control run in parallel only with DMEN (C). The bands from the Western blot were quantified by densitometry using Scion Image Software (n=3), mean ratio ± S.E.M; *p<0.05 compared with control group.

3.2 *In vivo* assay

3.2.1 *Effect of C₁₄ on inhibition of lung metastasis and tumor manifestation on base tail*

Experimental metastasis refers to the injection of tumor cells directly into the systemic circulation. The most common site of tumor cell injection employed for experimental metastasis models is the lateral tail vein of the animals. Tail vein injection results primarily in pulmonary metastasis. This model simulates all the processes that occur after the tumor cells enter the blood circulation (Yamaguchi et al., 2003). A B16 melanoma cell line that is characterized by progressively high metastatic potential was developed by Fidler et al., (1980). Based on the effect of C₁₄ on the viability of B16F10 melanoma cell (Fig. 1), we

chose the dose of 3.7 mg/Kg body weight, injected every three days, because concentrations much higher than this one do not normally reach the plasma blood (Cos et al., 2001; Cos et al., 2002). In this study, C₁₄ significantly inhibited B16F10 cell lung metastasis. Pathologic results showed that all animals of the positive control group showed lung metastasis while the treated group only 20 % of animal showed small *focus* lung metastasis (Fig. 4 B-C). The control group developed a tumor on base tail in 28 days (Fig. 4 D-E), while the treated group did not. Treatment with C₁₄ resulted in a 90 % regression of lung metastasis compared with the control groups.

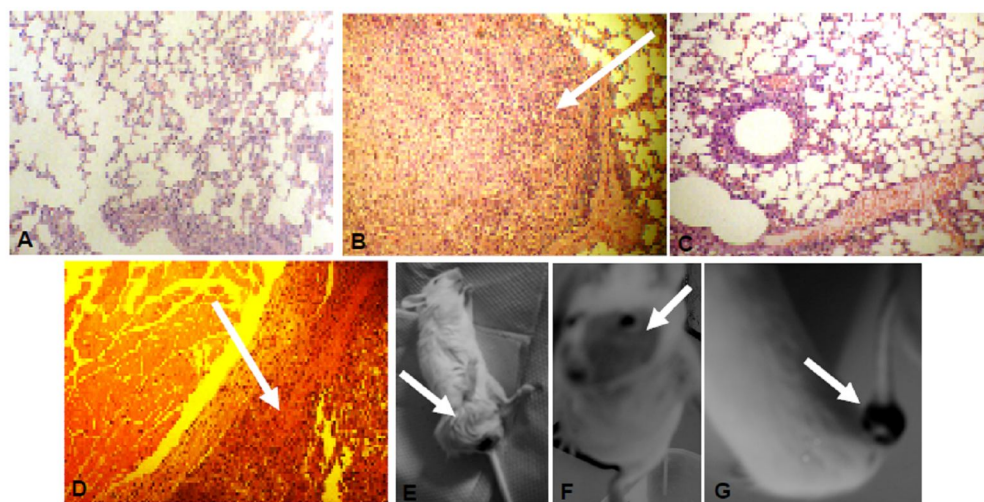


Fig. 4. C₁₄ effects on the experimental model of lung metastasis induced by B16F10 cells. Swiss mice (10 mouse/group) received intravenous injection of cells (1×10^6 cells/mouse) and killed 28 days later. The lungs were collected and fixed in formaldehyde solution. Formalin-fixed, paraffin-embedded sections of each lung tissue were stained routinely with H & E. The histopathology was completed using a Olympus microscope. (A) Negative control, (B) Positive control positive and (C) C₁₄ 3.7 mg/Kg body weight/intervals 3 days in whole lung tissue. (D) Tumor base tail Positive control. (E) Animal Positive Control with tumor base tail. (F) Tumor in the face of Positive control. (G) Tumor base tail in the animal treated with C₁₄ 3.7 mg/Kg body weight/intervals 3 days after the end of the treatment.

3.2.2 Toxicity studies in vivo

In the current research, no significant adverse consequences were observed in the light of gross measured such as weight of loss, ruffled fur and behavior change, comparing with the control groups. Furthermore, no pathologic changes in heart, lung, spleen, kidney, etc., were found via microscopic examination. In the pathological analysis of the liver, low toxicity with small necrotic area was observed (Fig. 5 C).

In order to evaluate the toxicity produced by the administration of C₁₄, the hematological parameters of the animals were determined on the twenty-eight day, and were then compared with the respective values obtained for normal control mice (negative control group). The results of the hematological parameters of the animals are shown in the Table 1. The hemoglobin content, and hematocrit values slightly decreased in the positive control group while the treated group did not show differences in relation to the negative control group. The positive control group also showed a decrease in neutrophil number and an increase in lymphocyte number. These results can be related to the tumor development. The treated group did not show alterations in these parameters.

The aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), urea and creatinine levels as well as oxidative stress metabolites (MDA and NPSH) in lung and liver remained in normal ranges. Compared with the control groups, none of the above parameters of the treated groups showed significant differences except the MDA that increased in brain (Table 1).

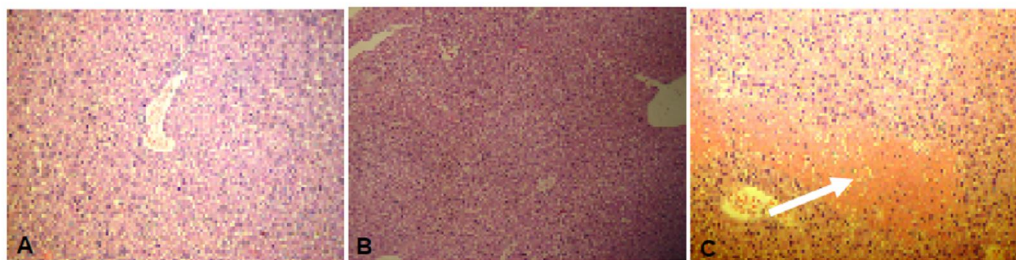


Fig. 5. Toxicity of C_{14} on the B16F10 cells experimental model of lung metastasis . Swiss (10 mouse/group) received intravenous injection of B16F10 melanoma cells (1×10^6 cells/mouse) and killed 28 days later. The liver were collected and fixed in formaldehyde solution. Formalin-fixed, paraffin-embedded sections of each liver tissue were stained routinely with H & E. The histopathology was completed using Olympus microscopy. (A) Control negative, (B) Control positive, (C) C_{14} 3.7 mg/Kg body weight/intervals 3 days in whole liver tissue.

Table 1. Effects of C₁₄ on serum and tissue of female mouse. AST and ALT values were expressed in U/L, urea and creatinine values were expressed in mg/dL, and TBARS values were expressed in nmol/g of tissue and NPSH mM.

	Parameters	Control negative	Control positive	Treatment
Serum chemistry	AST (IU/L)	56.5 ± 4.5	48 ± 0.92	50 ± 0.98
	ALT (IU/L)	127 ± 1.8	115 ± 9	110 ± 4.8
	Creatinine (mg/dL)	0.46 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.53 ± 0.03
	Urea (mg/dL)	58 ± 4.5	54 ± 4.7	53 ± 0.91
Tissue Chemistry	TBARS liver (nmol/g tissue)	102 ± 9.9	82 ± 8	62 ± 8*
	TBARS lung (nmol/g tissue)	119 ± 7.8	123 ± 14.5	103.5 ± 6.7
	TBARS brain (nmol/g tissue)	598 ± 28	752 ± 20	729 ± 24
	NPSH liver (mM)	7.35 ± 0.05	6.9 ± 0.42	7.05 ± 0.4
	NPSH brain (mM)	0.98 ± 0.023	1.07 ± 0.05	1.08 ± 0.12
Blood	Hemoglobin (g/dL)	11.2 ± 0.85	9 ± 0.58*	11 ± 0.62
	Hematocrit (%)	35 ± 2.4	29 ± 1.9	36 ± 1.6
	Neutrophil (%)	39 ± 4	12 ± 2*	24 ± 2
	Eosinophil (%)	0	3 ± 1.5	1 ± 0.5
	Mononuclear (%)	61 ± 3.8	85 ± 6.5	75 ± 3.8

3.2.3 Effect of C₁₄ in the survival rate of tumor bearing animals

C₁₄ treated animals survived an average of 125 days with an increase in life span of 47 %. All animals of positive control group (ten animals) developed cutaneous tumor on tail or in the face, 20 days after inoculation the B16F10 melanoma cells (Fig. 4 E-F), while only 10 % of animals developed tumor on tail (Fig. 4 G) 20 days after the end of the treatment (28 days with intervals of 3

days). The positive control group developed tumor in the lung (Fig. 7B) being possibly the reason of the animals death, approximately 60 days after the end of the treatment. Additionally all animals of the positive control presented lymphocytic filtering in the spleen (Fig. 8I), kidneys with small focus of metastasis and lung tumor with pigmented cells well defined (Fig. 8B - C) as well as necrosis in the lung and liver (Fig. 8G). In the treated group only 10 % of animals showed small focus of lung metastasis (Fig. 8D) and lymphocytic filtering in the kidney after the end of the treatment. The necrosis of the liver that appeared after 28 days of the treatment (Fig. 5C) was reverted after the end of the treatment (Fig. 8H).

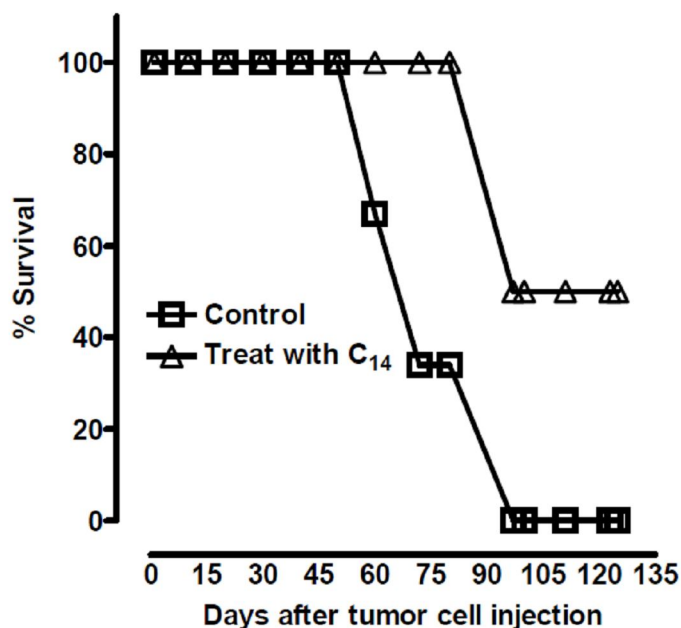


Fig. 6. Analysis of survival time after treatment with C₁₄.



Fig. 7. Lungs appearance of mouse injected intravenously with highly metastatic melanoma cells. The animals were treated with B16F10 cells (1×10^6 cells/mouse) as described in the methodology. (A) Negative control, (B) Positive control and (C) C_{14} 3.7 mg/Kg body weight/intervals 3 days.

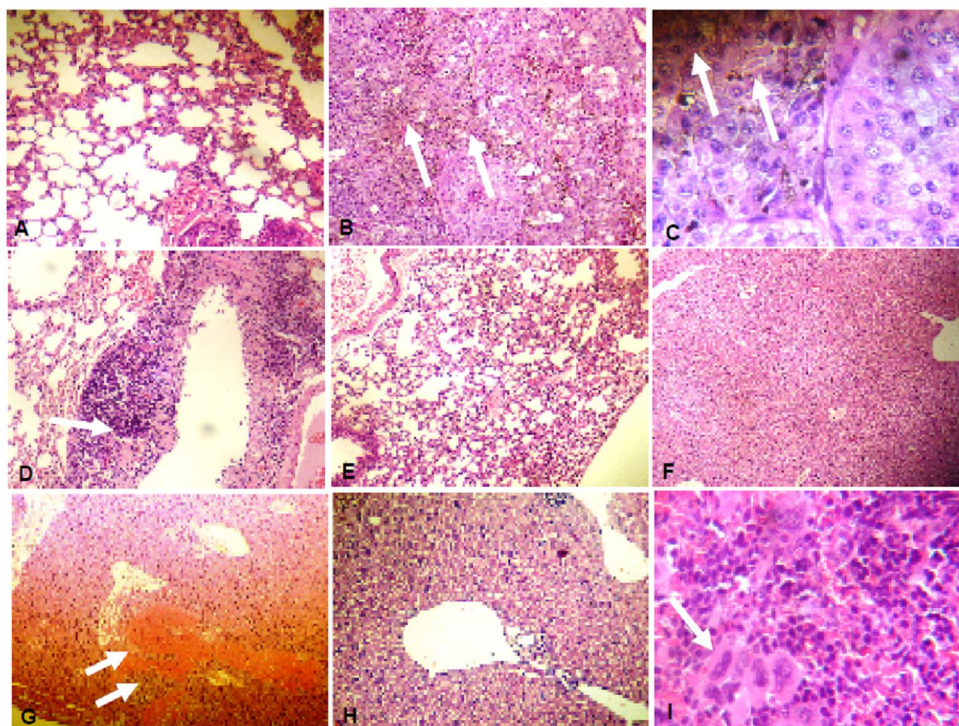


Fig. 8. Evaluation of toxicity and tumor development in lung after the end of the animals treatment with C₁₄. After the death of the animals the tissues were collected and fixed in formaldehyde solution. Formalin-fixed, paraffin-embedded sections of each tissue were stained routinely with H & E. The histopathology evaluation was completed using Olympus microscope. (A) Lung Negative control, (B) Lung tumor of the Positive control, (C) Lung tumor of the Positive control with pigmented cells, (D) Small area with metastasis in lung treated with C₁₄ (3.7 mg/Kg body weight/intervals 3 days), (E) Lung treated with C₁₄ 3.7 mg/Kg body weight/intervals 3 days, (F) Liver Negative control, (G) Liver Positive control with necrotic area, (H) Liver treated with C₁₄ 3.7 mg/Kg body weight/intervals 3 days, (I) Lymphocytic infiltration in spleen in control positive.

4. Discussion

Malignant melanoma is one kind of the most aggressive form for skin malignant tumor. Melanoma has proven to be highly resistant to conventional chemotherapy and surgery is still the main therapeutic method for melanoma. Patients with malignant melanoma generally have a high risk of recurrence and a short survival time (Mckinnon et al., 2003; Zhang et al., 2008). In previous studies we showed that C₁₄ presents cytotoxicity to B16F10 melanoma cells, L1210 and CEM lymphoblastic leukemia cells and these effects were related to the lipophilicity of this compound (Locatelli et al., 2008; Locatelli, et al.; Locatelli et al., 2009). In these works we also have shown that gallic acid derivatives were able to induce the transcription of nuclear factor NF- κ B and to promote alterations on cell metabolism through inhibition of GSH synthesis and ATP depletion. The challenge was to demonstrate that the compound can also be active *in vivo*.

Tumor invasion is an important step in the sequential process of metastasis. This process requires tumor cell adhesion, migration and enzymatic degradation of the extracellular matrix and the basal membrane (Harlozinska, 2005; Park et al., 2008). Since the metastatic potential of cancer cells is blocked the cancer patients can live longer (Zell et al., 2008). Thus, there is a great effort to develop new drugs with anti-metastatic potential. Our results showed that C₁₄ presented cytotoxic effect in B16F10 (Fig. 1 and 2) and was able to inhibit significantly the cell adhesion. The consequence of this inhibition is that the tumor cells are impaired to metastasize due to their low adhesion capacity, even supposing they detach from the melanoma foci. The cell adhesion molecules are responsible for migration and invasion mechanisms that occur in

metastatic tumor, between them we emphasized in ICAM-1 and VCAM-1. The effect of C₁₄ on the expression of ICAM-1 and VCAM-1 was evaluated (Fig. 3A-B). In western blot assays, we found that C₁₄ (75 μ M) inhibited significantly the ICAM-1 and VCAM-1 expression in B16F10 cells. Numerous studies have shown that growth and progression of most solid cancers are adhesion and angiogenesis-dependent (Sirohi et al., 2008; Bai et al., 2009). Tumor angiogenesis is strongly regulated by both positive and negative factors in tumor growth, including a few growth factors migration and adhesion of endothelial cells (O'Reilly et al., 1997).

It has been reported that the degree of malignancy is directly proportional to the expression of ICAM-1 and VCAM-1, as well as the dangerousness of metastasis tumor (Yao et al., 2007; Wang et al., 2004). Both molecules are associated with melanoma progression and increased risk of metastasis. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 was associated with accumulation of intravascular metastatic cells (Wang et al., 2004). The observation that stage 1 patient with ICAM-1 and VCAM-1 positive melanoma had significantly shorter disease-free interval and overall survival shorter than those with ICAM-1 and VCAM-1 negative tumors (Haas et al., 2005; Johnsons, 1999). Since blockade the metastatic potential of cancer cells helps cancer patients live longer.

Interestingly, the compound tested *in vivo* inhibited strongly the lung metastasis and showed high survival index. We suggest that this effect is associated with the capability of C₁₄ to promote the inhibition of cell adhesion molecules expression. Our previous studies showed that the inhibition of the tumor done by C₁₄ was associated with alteration in several cell functions (Locatelli et al., 2008; Locatelli, et al., 2009). The dose of 3.7 mg/Kg body

weight every three days of C₁₄ in animal experiments was deduced from the effective concentration *in vitro*. Using B16F10 bearing mice, a well established animal model for metastasis, we found that C₁₄ can reduce both the tumor growth and metastasis (lung and base tail) ability (Fig. 4 and 7). Moreover, recent studies have shown that the inhibitory effects of some drugs on the invasion and motility of tumor cell were related with NF- κ B activities and inhibition of the expression of cell adhesion molecules *in vitro* (Ebrahimnejad et al., 2004; Zhang et al., 2008; Woo et al., 2005) and the compound C₁₄ action seems to be via NF- κ B (Locatelli et al., 2009). The treated mice with C₁₄ reached 47 % of survival (Fig. 6) higher than the positive control group. This result is very interesting because of the standard treatment for patients with metastatic melanoma has not been reached better results. Normally, the survival does not exceed 15 to 20 % (Gava et al., 2006; Sun and Schuchter, 2001).

Furthermore these effects were achieved *in vivo* without showing any apparent sign of toxicity, as demonstrated by the histopathologic and biochemical assays (Fig. 5 and 8; Table 1). No serious adverse effects, such as ruffled fur, cachexia, anorexia, behavior changes or toxic death were found in the C₁₄ treated group, whereas, the current chemotherapy is followed by serious side effects such as nausea, vomiting, hair loss, neurotoxicity and myelosuppression. In general, the responses in patients are little lasting with relapses accompanied by resistance to the cytotoxic drugs in some heterogeneous survival cells because of the indirect selectivity of chemotherapeutic drugs (Bai et al., 2009; Shimamoto et al., 2001). At present the conventional dosing schedule is applied to balance the toxicity and efficacy,

but the severe side effects and the ultimate failures remain refractory obstacles to administration of most chemotherapy (Bai et al., 2009; Park et al., 2008). Consequently, new approaches are required to achieve a high therapeutic response rate.

Up to now, the exact antitumor mechanism of the tetradecylgallate is not completely clear. Three possible mechanisms may be involved. The first is the induction of apoptosis. The second is the induction of oxidative stress that promotes alterations in mitochondrial potential, which leads to apoptosis of tumor cells. The third is that the anti-metastatic agent reduces the infiltration of the tumoral cells in the others organs, since certain adhesive contacts with matrix are inhibited (Bai et al., 2009; Togna et al., 2000).

In conclusion, in the present study, we demonstrated the therapeutic potential of C_{14} for controlling tumor metastasis based on the observation of the inhibitory effect on cell adhesion expression and on the permanence of melanoma cancer cell line B16F10 at the new tissue. The administration of compound C_{14} increased the survival rate of the animals without causing cachexia or other collateral effects. It is probable that new therapies will come to substitute or to combine with already used therapies, increasing treatment effectiveness and reducing the incidence of collateral effects. C_{14} is a promising alternative to accomplish this goal.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina) and fellowship from Universidade do Contestado. This paper was part of the PhD work of Claudriana Locatelli of the Pharmacy post-graduation course. The group wishes to thank the Hospital Universitário (HU) for the use of their facilities.

REFERENCES

- Bai, R.Z., Wu, Y., Liu, Q., Xie, K., Wei, Y.Q., Wang, Y.S., Liu, K., Luo, Y., Su, J.M., Hu, B., Liu, J.Y., Li, Q., Niu, T., Zhao, Z.W., Yang, L., 2009. Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. *J Exp Clin Cancer Res* 28(31), 1-9.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Cos, P., Calomme, M., Sindambiwe, J.B., De Bruyne, T., Cimanga, K., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., 2001. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Med* 67(6), 515-519.
- Cos, P., Rajan, P., Vedernikova, I., Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Augustyns, K., Haemers, A., Vanden Berghe, D., 2002. In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free Radic Res* 36(6), 711-716.
- Ebrahimnejad, A., Streichert, T., Nollau, P., Horst, A.K., Wagener, C., Bamberger, A.M., Brümmer, J., 2004. CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol* 165(5), 1781-1787.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.
- Fidler, I.J., 1980. Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry* 10, 673-680.
- Flores, F.F., Pardi, P.C., Santos, R.P., Rando, D.G., Pablo, J.A., Suárez, Q., Maria, D.A., 2008. Antiproliferative and antimetastatic of DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, in B16F10 melanoma. *Ap Cancer Res* 28(2), 72-79.
- Gava, B., Zorzet, S., Spessotto, P., Cocchietto, M., Sava, G., 2006. Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 284-291.

- Haass, N.K., Smalley, K.S.M., Li, L.; Herlyn, M., 2005. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 18: 150-159.
- Harlozinska A., 2005. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 25, 3327-3333.
- Hiscox, S.; Hallet, M.B.; Puntis, M.C.A.; Jiang, W.G., 1995. Inhibition of cancer cell motility and invasion by interleukin-12. *Clin Exp Metastasis* 13, 396-404.
- Johnson, J.P., 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18, 345-357.
- Kornberg, L., Earp, S., Parsons, J.T., Schaller, M., Juliano, R.L., 1992. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* 267, 23439-23442.
- Lansky, E.P., Newman, R.A., 2007 *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 19-109(2),177-206.
- Locatelli, C., Leal, P.C., Yunes, R.A., Nunes, R.J., Creczynski – Pasa, T.B., 2009. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chem Biol Interact* doi:10.1016/j.cbi.2009.06.019
- Locatelli, C., Rosso, R., Santos-Silva, M.C., Souza, C.A., Licínio, M.A., Leal, P.C., Bazzo, M.L., Yunes, R.A., Creczynski–Pasa, T.B., 2008. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg Med Chem* 16, 3791–3799.
- Lu, Z., Nie, G., Belton, P.S., Tang, H., Zhao, B., 2006. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochem Int* 48, 263-274.
- Maruta, S., Takiguchi, S., Ueyama, M., Kataoka, Y., Oda, Y., Tsuneyoshi, M., Iguchi, H., 2008. A role leukemia inhibitory factor in melanoma-induced bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 26(2),133-41

- Mckinnon, J.G., Yu, X.Q., McCarthy, W.H., Thompson J.F., 2003. Prognosis for patients with thin cutaneous melanoma: long-term survival data from New South Wales Central Registry and the Sydney Melanoma Unit Cancer, 98(6), 1223-1231.
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., Folkman, J., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.
- Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.
- Park, T.Y., Park, M.H., Shin, W.C., Rhee, M.H., Seo, D.W., Cho, J.Y., Kim, H. M., 2008. Anti-metastatic potential of ginsenoside Rp1, a novel ginsenoside derivative. *Biol Pharm Bull* 31(9), 1802-1805.
- Rosso, R., Vieira, T.O., Leal, P.C., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Creczynski-Pasa, T.B., 2006. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. *Bioorg Med Chem* 14(18), 6409-13.
- Saleem, A., Husheem, M., Härkönen, P., Pihlaja, K., 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J Ethnopharmacol* 81(3), 327-36
- Savi, L.A., Leal, P.C., Vieira, T.O., Rosso, R., Nunes, R. J., Yunes, R.A., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M., Simões, C.M.O., 2005. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects the synthetic alkyl-esters of gallic acid. *Arzneimittelforschung* 55, 66-75.
- Shimamoto, T., Tomoda, A., Ishida, R., Ohyashiki, K., 2001. Antitumor effects of a novel phenoxazine derivative on human leukemia cell lines in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 7, 704-708.
- Sirohi, B., Smith, K., 2008. Bevacizumab in the of breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther* 8, 1559-1568.
- Sun W., Schuchter, L.M., 2001. Metastatic melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2, 193-202.

- Togna, G.I., Togna, A.R., Franconi, M., Caprino, L., 2000. Cisplatin triggers platelet activation. *Thromb Res* 99, 503-509.
- Van De Loosdrecht, A.A., Nennie, E., Ossenkoppele, G.J., Beelen, R.H., Langenhuijsen, M.M., 1991. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Meth* 141(1), 15-22.
- Van der Heijden, C. A., Janssen, P. J., Strik, J. J., 1986. Toxicology of gallates: a review and evaluation. *Food Chem Toxicol* 24, 1067-1070.
- Veluri, R., Singh, R.P., Liu, Z., Thompson, J.A., Agarwal, R., Agarwal, C., 2006. Fraction of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27, 1445-1453.
- Wang, Y., Zhou, B., Li, J., Cao, Y.B., Chen, X.S., Cheng, M.H., Yin, M., 2004. Inhibitors of 5-lipoxygenase inhibit expression of intercellular adhesion molecule-1 in human melanoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 25, 672-677.
- Woo, C.H., Lim, J.H., Kim, J.H., 2005. VCAM-1 upregulation via PKC δ -p38 kinase-linked cascade mediates the TNF- α -induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. *Am J Physiol Lung Mol Physiol* 288, L307-L316.
- Yamaguchi, H., Kitayama, J., Takuwa, N., Arikawa, K., Inoki, I., Takehara, K., Nagawa, H., Takuwa, Y., 2003. Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific ositive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *J Biochem* 374, 715-722.
- Yao, Z., Che, X., Lu, R., Zheng, M., Zhu, Z., Li, J., Jian, X., Shi, L., Liu, J., Gao, W., 2007. Inhibition by tyrosinleutide (YSL) on the invasion and adhesion of the mouse melanoma cell. *Mol Med* 13(1-2), 14-21.
- Zell, J. A., Ou, S.H., Ziogas, A., Anton-Culver, H., 2008. *Cancer* 112, 136-143.
- Zhang, S., Li, M., Gu, Y., Liu, Z., Xu, S., Cui, Y., Sun, B., 2008. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 27(60), 1-9.

4. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos tumorais o tratamento dos cânceres continua sendo um desafio para o meio científico, principalmente porque a quimioterapia convencional está freqüentemente associada ao fenômeno de desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos e a grande toxicidade, o que limita a eficiência terapêutica (LESZCZYŃIECKA *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, estudos com compostos naturais e/ou compostos sintéticos de origem natural tem sido intensificados. Podemos destacar os fármacos antitumorais de origem natural como a camptotencina, taxol, vincristina e vimblastina, os quais são alguns dos representantes mais importantes deste grupo de medicamentos antitumorais. Associado aos estudos com compostos de origem natural com ação terapêutica, estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de uma dieta rica em frutas e vegetais reduz o risco de incidência de cânceres (SEERAM *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos mostram os efeitos antioxidante, antifúngico e antitumoral do ácido gálico e seus ésteres metil, propil, octil e lauril galato. No entanto, estes trabalhos não elucidam o mecanismo de ação antitumoral das moléculas, além do que o efeito antitumoral está direcionado principalmente aos estudos das leucemias crônicas e ao tumor de mama, não apresentando relatos do seu efeito nas leucemias agudas e melanoma.

Nossos trabalhos (artigos 1 e 2) mostram que os ésteres do ácido gálico que apresentam maior efeito antitumoral tanto em leucemia aguda quanto em melanoma são os derivados que contém entre 8 e 14 carbonos na cadeia lateral. Verifica-se assim, que existe uma faixa de hidrofobicidade ideal para esta atividade, a qual está diretamente relacionada com as modificações químicas proporcionadas na molécula de ácido gálico, o que modifica suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, alterando sua afinidade por alvos celulares e a difusão através das membranas lipídicas. A hidrofobicidade das moléculas estudadas é avaliada pelo valor de Log P (Artigo 1). O Log P é uma das principais propriedades físico-químicas de uma determinada molécula com potencial atividade medicinal, pois expressa sua lipossolubilidade relativa e, portanto auxilia na elucidação do mecanismo de ação.

Estas características físico-químicas explicam o efeito citotóxico distinto dos derivados do ácido gálico aqui analisados, além do que estes resultados

corroboram com os encontrados por Sabki e colaboradores (2000), e Lu e colaboradores (2006), que demonstraram que o ácido gálico foi capaz de induzir apoptose em células de leucemia promielocítica HL-60 e que o derivado do ácido gálico com cadeia carbônica na mesma faixa de Log P que obtivemos (lauril galato), teve esta capacidade aumentada, além de que o lauril galato mostra melhor efeito antioxidante quando comparado ao ácido gálico.

Outra característica química que podemos salientar é que derivados do ácido gálico com alterações da função química éster para amida, bem como a metilação dos grupos hidroxilas ao redor do anel não apresentam efeito antitumoral (resultados não mostrados nos artigos), resultados semelhantes foram demonstrados por Sabki e colaboradores (2000), com o laurilamida galato. As estruturas químicas dos galatos modificados sem ação citotóxica podem ser visualizadas na figura 9.

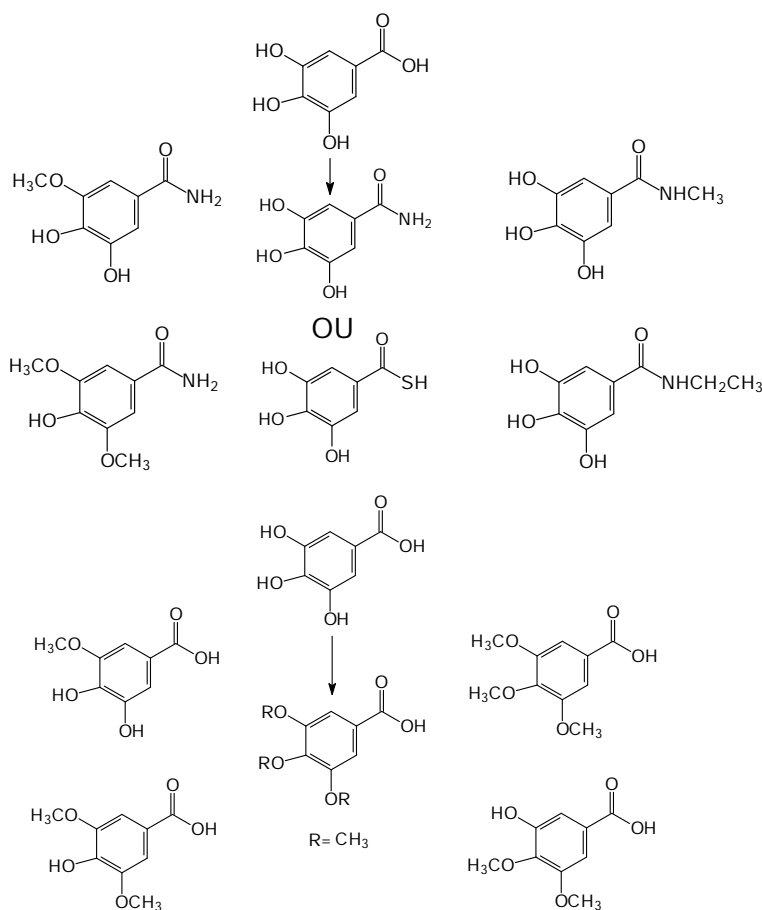


Figura 9. Estrutura química dos galatos sem ação citotóxica.

Adicionalmente, Serrano e colaboradores (1998), demonstraram que o lauril galato apresenta um efeito citotóxico 40 vezes maior que o ácido gálico em linhagens tumorais, o que provavelmente está relacionado com a melhor interação dos compostos mais lipofílicos com a membrana celular e/ou maior interação com enzimas chaves para sua ação, uma vez que o potencial inibitório *in vitro* para proteína quinase purificada foi 10 vezes maior que do ácido gálico (LÁZARO *et al.*, 1995). Portanto, o efeito citotóxico mostrado nos artigos 1 e 2 em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda L1210 e CEM e de melanoma B16F10, está diretamente relacionado com a estrutura específica do galato e sua afinidade pela membrana lipídica.

Embora vários trabalhos mostrem que o ácido gálico e seus ésteres octil e lauril galato apresentem efeito citotóxico sobre várias linhagens tumorais, o mecanismo de ação dos mesmos ainda não está esclarecido. Nossos resultados (artigos 1 e 2), mostraram que a morte das células tumorais ocorre pela via apoptótica. Resultados importantes uma vez que, as células tumorais de melanoma apresentam uma grande resistência a morte por apoptose, fenômeno que está relacionado com a alta concentração de glutathione presente nestas células e com o alto potencial metastático do tumor.

Nossos resultados mostraram que tanto nas linhagens de leucemia linfóide aguda quanto de melanoma ocorre a fragmentação do DNA, caracterizando assim a morte por apoptose. A degradação do DNA durante a apoptose é regulada e inicia com a formação de fragmentos maiores, de 300 a 500 kilobases (OBERHAMMER *et al.*, 1993; WALKER *et al.*, 1999). Quando a endonuclease ataca as regiões de ligação entre as duas fitas de DNA, ocorre a clivagem internucleossomal, que resulta na formação de fragmentos de 180 a 200 pares de base e seus múltiplos. Na eletroforese em gel de agarose, corada com brometo de etídio, estes fragmentos apresentam um padrão de bandas característico quando visualizadas em luz UV (Figuras 4 e 2, artigos 1 e 2 respectivamente).

A base dos estudos com substâncias antitumorais está direcionada a compostos capazes de promover a apoptose (ISUZUGAWA *et al.*, 2001). Além, da visualização da apoptose através da fragmentação do DNA mostrada nos artigos 1 e 2, também observamos esta através do método de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio (Figura 2, artigo 2).

Outro fator que contribuiu para reforçar a hipótese de morte celular por apoptose foram as alterações nas concentrações intracelulares de ATP (Figura 5, artigo 2) observadas nas células de melanoma B16F10. Esta alteração é explicada pelo fato de que durante o processo de apoptose é necessário um aumento inicial nas concentrações de ATP para formação do apoptossoma e após o rompimento da mitocôndria uma depleção nestas concentrações resultando na morte celular (SKULACHEV, 2006).

Alguns trabalhos reportam que a indução da apoptose pelo ácido gálico e por seus ésteres propil, octil e lauril galato está relacionada com o aumento da produção do radical peróxido intracelular ou alterações no potencial de membrana mitocondrial. Estes fenômenos podem estar relacionados com a superprodução de espécies reativas de oxigênio e com o aumento intracelular de cálcio. Tais processos culminam na liberação do citocromo c pela mitocôndria e ativação da caspase 9 (INOUE *et al.*, 1995; INOUE *et al.*, 2000; ISUZUGAWA *et al.*, 2001). O octil e lauril galato, além das alterações citadas também parecem agir inibindo as proteínas tirosinas quinases, além de ativar as proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas (SERRANO *et al.*, 1998; ROY *et al.*, 2000).

As mitocôndrias possuem um duplo papel, atuando tanto no metabolismo energético quanto na morte celular (REGULA *et al.*, 2003). Diversos compostos podem afetar a bioenergética mitocondrial, o que significa um grande risco para a sobrevivência celular. Estas substâncias podem provocar alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna e/ou na velocidade de transporte de elétrons, através da cadeia respiratória.

Além das alterações nas concentrações intracelulares de ATP, as quais modificam o potencial mitocondrial induzindo a apoptose, outro fator que pode estar relacionado com a morte induzida por estes compostos é a depleção nas concentrações de glutatona intracelular. Nossos resultados mostram que o ácido gálico e seus ésteres depletam as concentrações de glutatona total citosólica e mitocondrial em ambas as linhagens celulares L1210 e B16F10, sendo a depleção citosólica mais acentuada na linhagem de leucemia linfóide aguda L1210, do que na linhagem de melanoma B16F10. No entanto, a glutatona mitocondrial foi depletada similarmente nas duas linhagens celulares, mostrando assim que a morte pode estar relacionada com alterações da função mitocondrial. Os resultados do artigo 2 (tabela

1) também mostram que os derivados do ácido gálico são capazes de depletar o conteúdo de glutathiona reduzida e levar um aumento da glutathiona oxidada, uma vez que, a relação glutathiona reduzida/glutathiona oxidada está diminuída. Através destes resultados pode-se inferir que os galatos são capazes de induzir um estresse oxidativo, o qual foi comprovado através da determinação por microscopia de fluorescência das espécies reativas (Figura 3 artigo 2).

As células tumorais tendem a exibir altas concentrações de glutathiona intracelular, possivelmente como uma resposta adaptativa ao metabolismo acelerado e as elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio (BATIST *et al.*, 1996). Por sua vez, as células de melanoma B16-F10 também possuem uma alta concentração de glutathiona intracelular, e esta particularidade está relacionada à resistência dessas células à quimioterapia e à radioterapia. Assim, a depleção de glutathiona tem sido descrita como uma potencial estratégia para a sensibilização das células tumorais (BENLLOCH *et al.*, 2005).

Recentemente, tem-se associado alterações na concentração de glutathiona mitocondrial com a ativação das vias sinalizadoras e com a expressão de genes que regulam a apoptose, o crescimento e a diferenciação celular (ZAMZAMI *et al.*, 1996; FILOMENI, 2002). A glutathiona mitocondrial tem um papel fundamental no controle da geração de espécies reativas de oxigênio e na modulação da morte celular por várias vias (GARCIA-RUIZ & FERNANDEZ-CHECA, 2006). Alterações nas concentrações de GSH e no estado redox da mitocôndria associam-se com o estresse oxidativo induzido por vários agentes oxidantes (McKERNAN *et al.*, 1991; BRODIE & REED, 1992).

Ao observarmos os resultados referentes às concentrações de glutathiona mitocondrial (Figuras 6 e Tabela 1, artigo 1 e 2 respectivamente) verificamos que os compostos que promovem maior depleção são também os que produzem maiores quantidades de espécies reativas (Figura 3, artigo 2), analisada através de microscopia de fluorescência. Quando incubamos estes compostos associados a dois importantes antioxidantes, SOD e Trolox® (análogo da vitamina E hidrossolúvel) verifica-se que a produção de espécies reativas é diminuída significativamente, bem como a morte celular, principalmente com o Trolox®. Níveis elevados ou moderados de espécies reativas de oxigênio (EROs) são

potencialmente citotóxicos e bloqueiam a proliferação celular, por induzirem a morte por apoptose e até por necrose (DREHER & JUNOD, 1996).

Vários compostos naturais podem induzir a morte celular por apoptose, em células tumorais, por aumentar a produção de espécies reativas intramitocondriais, seguida pela formação de poros na mitocôndria, tornando-a permeável, ocasionando a liberação de citocromo c (LEE *et al.*, 2001).

A vitamina E inibe a peroxidação lipídica através do seqüestro de radicais peroxil lipídicos ($\text{LO}_2\cdot$); adicionalmente reage com o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), com o radical peroxil ($\text{RO}_2\cdot$), com o radical superóxido ($\text{O}_2\cdot$); provavelmente, reage com o radical hidroperoxil ($\text{HO}_2\cdot$) (HALLIWEL, 2000); tem um efeito protetor no organismo, resultado da inibição dos radicais livres, e reduz também a citotoxicidade de alguns agentes antitumorais (GREENBERG *et al.*, 1994; SYLVESTER, 2007). Através dos resultados mostrados, podemos inferir que a associação de SOD ou de Trolox®, com ácido gálico e seus ésteres, diminuíram a toxicidade para as células de melanoma B16-F10, evidenciando a característica pró-oxidante destas moléculas, neste contexto.

O fator de transcrição nuclear NF- κ B apresenta um papel dúbio tanto em células normais quanto em células tumorais, pois quando é ativado, migra para o núcleo promovendo a transcrição tanto de proteínas anti quanto pró-apoptóticas. O NF- κ B é ativado em condições pró-oxidantes (MEYSKENS *et al.*, 1999), sendo assim, podemos inferir que a indução do NF- κ B promovida pelos ésteres do ácido gálico, principalmente o octil galato (Figuras 7 e 7, artigos 1 e 2 respectivamente), está diretamente ligada a produção de espécies reativas por estes compostos. O efeito citotóxico dos galatos pode assim, estar associado às propriedades pró-oxidantes dos compostos fenólicos (GOMES *et al.*, 2003).

Kashami-Sabet e colaboradores (2004) propõem que o NF- κ B apresenta um papel central na metástase dos melanomas humanos, favorecendo a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, o que facilitaria a progressão vascular destas células, entretanto, outros pesquisadores mostram a importância da ativação do NF- κ B para a ação antitumoral de alguns fármacos, destacando-se a doxorubicina (BIAN *et al.*, 2001). A ativação do NF- κ B apresenta uma relação com o aumento da morte celular induzida por alguns fármacos, a qual pode estar ligada a

ativação do receptor de morte celular Fas, bem como ao aumento de espécies reativas induzida por estes agentes (WANG *et al.*, 1998; BIAN *et al.*, 2001).

RYAN e colaboradores (2000), também relataram que a indução da apoptose mediada pelo p53 requer a ativação do NF- κ B. Sendo assim, pela análise dos resultados mostrados (Figuras 7 dos artigos 1 e 2) pode-se sugerir que o ácido gálico e seus ésteres induzem a morte celular por apoptose via produção de espécies reativas, as quais possibilitam a ativação do NF- κ B, o que provavelmente resulte no aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, entre outras).

No entanto, alguns pesquisadores propõem que os derivados do ácido gálico com mais de 8 carbonos não conseguem entrar na célula (TAMELA *et al.*, 2004), mas sim exercem sua atividade via receptores presentes na membrana celular, pode-se sugerir que a ativação do NF- κ B, bem como a indução da morte pode estar relacionada com a ligação destes compostos ao receptor de morte celular Fas.

A ativação do receptor de morte bem como, a indução de espécies reativas, viria ao encontro da proposta sugerida por Isuzugawa e colaboradores (2001). Estes autores relatam que o aumento de ROS inibe a bomba Ca^{2+} ATP-dependente e estimulam a liberação dos estoques de Ca^{2+} via mensageiros intracelulares IP3, sendo assim, o aumento de Ca^{2+} promoveria a ativação das caspases induzindo a apoptose.

Os resultados das figuras 3, 6 e 7 do artigo 2 mostra que possivelmente o mecanismo de indução de morte dos galatos é diferente. A morte celular induzida pelo galato 8 pode estar relacionada com a geração de espécies reativas, os galatos 10 e 12 com a ativação do NF- κ B enquanto, o galato 14 com a inibição da adesão celular. Estes diferentes mecanismos de indução de morte podem ter uma relação direta com a hidrofobicidade dos compostos. Estudos realizados por Dodo e colaboradores (2008), mostram que a hidrofobicidade da cadeia lateral de derivados do ácido gálico é importante para atividade antiproliferativa e ainda que a cadeia lateral pode contribuir para melhorar a permeabilidade da membrana celular, bem como facilitar a interação com moléculas alvo.

Nossos resultados mostram (Figura 1, artigo 2) que possivelmente o melhor efeito citotóxico encontrado nas células de melanoma com o galato 14 está relacionado com capacidade da molécula de inibir a adesão celular. Estes dados são importantes uma vez que estudos mostram que pacientes com melanoma que apresentam moléculas de adesão sérica têm maior resistência ao tratamento quimioterápico, portanto estas moléculas podem ser um possível alvo terapêutico (JOHNSON, 1999).

A habilidade das neoplasias malignas de produzirem metástase em órgãos distantes ao do tumor primário (origem) é um evento clínico de ocorrência letal em muitas doenças neoplásicas (DORA *et al.*, 2006). Os principais sítios de invasão dos tumores metastáticos são o pulmão e o fígado. Um importante modelo experimental para avaliar o potencial antimetastático de novos compostos é a administração direta em camundongos de células tumorais na circulação.

Uma vez que o melanoma é um tumor altamente agressivo e com grande capacidade de metástase principalmente para o pulmão e os resultados nos ensaios *in vitro* mostram que o galato 14 apresenta grande capacidade de inibir a adesão celular decidimos testar este galato em modelo de metástase *in vivo*.

No artigo 3 mostramos o modelo de metástase pulmonar desenvolvido através da inoculação intravenosa na veia caudal média de camundongos Swiss. A veia caudal média é um vaso tributário direto da veia cava inferior nos camundongos (COOK, 2005). Diversos trabalhos são encontrados na literatura relatando a utilização de células de melanoma murino B16F10 através dessa via de inoculação e o desenvolvimento exclusivo de metástase pulmonar (NETLAND & ZETTER, 1984; SONG *et al.*, 1997; HYODOU *et al.*, 2004; DORA *et al.*, 2006).

Os resultados do artigo 3 mostram que o galato 14 é capaz de inibir a adesão celular por diminuir a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, as quais são responsáveis pela migração e invasão das células tumorais em outros órgãos e tecidos. Alguns trabalhos mostram que a malignidade e a capacidade metastática do melanoma estão diretamente relacionadas com a maior expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (WANG *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2007). Pacientes com expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 apresentam menor sobrevida em relação aos pacientes que não expressam estas moléculas (HAAS *et al.*, 2005).

Além de inibir a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 o galato 14 mostrou ter um grande efeito antimetastático *in vivo*, bem como baixa toxicidade no modelo experimental utilizado. As células de melanoma B16F10 apresentam um grande potencial metastático. Quando administradas por via parenteral através da veia da cauda de camundongos demonstram efetiva metástase pulmonar (POSTE *et al.*, 1980). A potencial eficácia terapêutica do galato 14 foi verificada pela sua capacidade de inibir a metástase pulmonar nos camundongos (Figuras 4, 7 e 8, artigo 3). Estes resultados são interessantes uma vez que a principal causa de morte por melanoma é sua capacidade metastática o que dificulta o tratamento quimioterápico (STANFORD *et al.*, 2008). O bloqueio de metástases nos tumores ajuda prolongar a vida de pacientes com câncer.

Apenas 10% a 20% dos pacientes com melanoma metastático em tratamento com quimioterapia têm resposta satisfatória em geral de curta duração (EWEND, CAREY, BREM, 1996). Os tratamentos quimioterápicos disponíveis para o melanoma não apresentam aumento na expectativa de vida dos pacientes que em geral não passa de 8 meses. Os resultados obtidos com a sobrevida dos animais tratados com o galato 14 (artigo 3), mostram que este composto apresenta significativo aumento na sobrevida dos animais. Através destes dados pode-se inferir que o tratamento do melanoma metastático com o galato 14 apresentou resultados positivos expressando sua eficácia na atividade antitumoral e antimetastática *in vitro* (artigo 2) e *in vivo* (artigo 3). Outro fator importante no tratamento quimioterápico é a elevada toxicidade dos fármacos disponíveis no mercado, os quais apresentam em geral o desenvolvimento de mielosupressão, dano renal e hepático, além de náuseas e perda de peso, o que pode limitar a aplicação clínica de alguns compostos com ação antitumoral (BAI *et al.*, 2009).

Estudos toxicológicos mostram que o ácido gálico, bem como alguns de seus derivados não apresentam efeito tóxico quando administrado em roedores em doses que variam de 120 a 1000 mg/Kg diariamente (VAN der HEIJDEN & JANSSEN, 1986; LU *et al.*, 2006). Os resultados de toxicidade renal e hepática, bem como os testes histológicos, mostrados nesta tese indicam que o galato 14 apresenta baixa toxicidade quando administrado na dose de 122 mg/Kg de peso a cada três dias. Alterações como pelos arrepiados, caquexia, anorexia, alterações comportamentais ou morte por toxicidade não foi observada durante o período de

tratamento. A baixa toxicidade encontrada, e o bom potencial antitumoral do galato 14 mostram que este composto pode ser uma estratégia terapêutica para novos estudos no tratamento do melanoma, uma vez que seu mecanismo de ação ainda não foi completamente esclarecido. Segundo os dados deste trabalho (artigo 2 e 3) três possíveis mecanismos podem estar envolvidos. Primeiro a indução da apoptose, segundo a promoção de um estresse oxidativo e terceiro a inibição da adesão celular o que dificulta o desenvolvimento de metástase.

5. CONCLUSÕES

O ácido gálico é uma molécula química obtida geralmente de taninos hidrolizáveis de plantas, apresenta uma estrutura relativamente simples, a qual é facilmente modificada principalmente através de esterificações no seu grupamento ácido. De acordo com os resultados obtidos podemos inferir o que segue:

1. Dos derivados do ácido gálico estudados os que mostraram potencial antitumoral nas linhagens de leucemia linfóide aguda e de melanoma são os que apresentam entre 8 e 14 carbonos esterificados ao grupamento ácido do ácido gálico;

2. A lipossolubilidade influencia na interação dos compostos com as células tumorais, sendo um importante fator para exercer a atividade antitumoral;

3. Todos os compostos que apresentam atividade antitumoral em ambas as linhagens celulares induzem a morte através da apoptose;

4. Introdução de grupamentos metila nas hidroxilas presentes no anel da molécula de ácido gálico ou seus ésteres, bem como substituição da função éster pela função amida proporcionam a perda da atividade antitumoral;

5. A atividade antitumoral parece estar relacionada à depleção de glutathione total citosólica e mitocondrial, a qual pode estar diretamente ligada com a indução de um estresse oxidativo produzido pelos compostos, uma vez que foi observada uma diminuição na relação GSH/GSSG com conseqüente aumento de glutathione oxidada nas células de melanoma;

6. Os derivados do ácido gálico são capazes de promover uma inibição da síntese de glutathione evidenciado pela capacidade de inibir a atividade da γ -glutamylcisteína sintetase nas células B16F10;

7. Os compostos foram menos citotóxicos quando associados aos agentes antioxidantes, tornando notória a atividade pró-oxidante dos mesmos para as células de melanoma. Além disso, a produção de radicais livres intracelulares também foi verificada após o tratamento das células com os mesmos compostos;

8. Os compostos depletaram as concentrações intracelulares de ATP, sugerindo que podem estar interferindo no potencial de membrana mitocondrial, diminuindo a respiração celular e, conseqüentemente, prejudicando a síntese de ATP;

9. Os compostos não apresentaram toxicidade às células não tumorais nas concentrações efetivas *in vitro*;

10. A atividade antitumoral dos compostos com 8, 10 e 12 carbonos na cadeia lateral pode estar relacionada com a capacidade destes em produzir espécies reativas e a indução da ativação do NF- κ B;

11. Através dos dados obtidos *in vitro* evidenciamos uma inibição da adesão celular, a qual também pode contribuir para a atividade antitumoral destes compostos, bem como pode estar relacionada a um potencial antimetastático;

12. Os resultados *in vivo* e *in vitro* obtidos com o galato 14 mostram que este composto é capaz de inibir a adesão celular, bem como promover uma atividade antimetastática;

13. Através das análises bioquímicas e histológicas verificamos que o galato 14 apresentou uma baixa toxicidade nos ensaios realizados com o modelo experimental *in vivo*.

6. PERSPECTIVAS

Uma vez que, os tratamentos antitumorais disponíveis até o momento não apresentam grande efetividade no tratamento das leucemias agudas e do melanoma, além de serem altamente tóxicos e frequentemente não específicos, a pesquisa com novos compostos que sejam mais específicos e menos tóxicos pode contribuir para efetividade dos tratamentos antitumorais.

Até o momento este trabalho proporcionou algumas conclusões pertinentes, e, ao mesmo tempo, as seguintes perspectivas promissoras de estudos relevantes:

- 1.A disfunção mitocondrial, causada por esses compostos, pode ser investigada através da avaliação do potencial de membrana mitocondrial;
- 2.Pode ser avaliado se a morte por apoptose ocorre pela via intrínseca ou extrínseca, através da determinação da liberação do citocromo c, da inibição das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, da ativação das proteínas pró-apoptóticas, bem como a determinação da ativação do receptor de morte celular Fas;
- 3.Realizar estudos de toxicidade e potencial antimetastático para os demais galatos;
- 4.Realizar estudos de incorporação dos compostos em sistemas particulados e as consequências mecánísticas.

7. REFERÊNCIAS

AGARWALA, S., REYDERMAN, L., STATKEVICH, P. Pharmacokinetics study of temozolomide penetration into the in a patient with dural melanoma. **Ann Oncol** p.659-668, 1998.

AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE L., *et al.* Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol** v. 53(11), p. 1649-1657, 1997.

ALLEN, R. G. & TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol** v. 28(3), p. 463-499, 2000.

ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Quim Nova** v. 28(1), p. 118-129, 2005.

ANG, K. K., GEARA, F.B., BYERS, R., PETERS, L.J. Radiotheray for melanoma. In: BALCH, C.M., HOUGHTON, A.M., SOBRE, A.J., SONG, S. **Cutaneous Melanoma**; Saint Louis, Quality Medical Publishing, p. 389-403, 1998.

ANTONSSON, B., MARTINOU, J.C. The Bcl-2 protein family. **Exp Cell Res** v. 10(256(1)), 2000.

AVRIL, M. F., AAMDAL, S., *et al.* Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. **J Clin Oncol** v. 22, p. 1118-1125, 2004.

BAI, R.Z., WU, Y., *et al.* Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. **J Exp Clin Cancer Res** v. 28(31), p. 1-9, 2009.

BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2003.

BALLATORI, N., HAMMOND, C.L., *et al.* Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicol Appl Pharmacol** v. 204, p. 238– 255, 2005.

BASS, B.P., TANNER, E.A., *et al.* Cell-autonomous requirement fo DNaseI in nonapoptotic cell death. **Cell Death Differ** 2009.

BATIST, G., SCHEETER, R.L. *et al.* **Glutathione system and drug resistance**. New York: Dekker, p. 503-521, 1996.

BENE, M.C., BERNIER, M., *et al.* Acute myeloid leukaemia MO: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. **Br J Haematol** v. 113(3), p. 737-745, 2001.

BENLLOCH, M., ORTEGA, A. *et al.* Acceleration of glutathione efflux and inhibition of γ -glutamyltranspeptidase sensitive metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. **J Biol Chem** v. 280(8), p. 6950-6959, 2005.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D. *et al.* The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. **Br J Haematol** v. 47(4), p. 553-61, 1981.

BIAN, X., McALLISTER-LUCAS, L. M., *et al.* NF- κ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. **J Biol Chem** v. 276(52), p. 48921-48929, 2001.

BIROCCIO, A., BENASSI, B., *et al.* Glutathione influences c-myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells. **J Biol Chem** v. 277(46), p. 43763-43770, 2002.

BONNET, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chem Soc Rev** v. 24, p. 19-33, 1995.

BOYLE, P., MAISONNEUVE, P., DORE, J.F. Epidemiology of malignant melanoma. **Br Med Bull** v. 51, p. 523-547, 1995.

BRAS, M., QUEENAN, B., SUSIN S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochem** v. 70(2), 2005.

BRODIE, A. E. & REED, D.J. Glutathionedisulfite reduction in tumor mitochondria after-butylhydroperoxide treatment. **Chem Biol Interact** v. 84, p. 125 -132, 1992.

BULLIAR, J.L., COS, B., ELWOOD, J.M. Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand. **Cancer Causes Control** v.5, p. 5-234, 1994.

CASTEDO, M., PERFETTINI, J.L., *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene** v. 23, p. 2825-2837, 2004.

Catálogo BioAgency 2004-05, Cap. 9 - Apoptose e Inflamação. Disponível em <http://www.bioagency.com.br/informacao/default.asp>. Acesso em 22 de dezembro de 2006.

CHAKRABARTY, A. & GEISSE, J.K. Medical therapies for non-melanoma skin cancer. **Clin Dermatol** n. 22, p.183-188, 2004.

CEN, D., GONZALEZ, R.I., *et al.* Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. **Mol Cancer Ther** v. 1, p. 197-204, 2002.

CHOTIA, J. & JONES, E.Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. **Annu Rev Biochem** v. 66, p. 823-862, 1997.

CLARK, W.H., ELDER, D.E. *et al.* A study of tumor progression. The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol** v. 15, p. 1147-1165, 1984.

COMPTON, M.M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. **Cancer Metastasis Rev** n. 11, 1992.

COOK, M.J. The anatomy of the laboratory mouse. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/cookbook/contents.shtml>>. Acesso em dezembro de 2005.

CORY, S., ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer** v. 2(9), 2002.

COULTAS, L., STRASSER, A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. **Semin Cancer Biol**. V. 13(2), 2003.

CURTIN, J.F., DONOVAN, M., COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J Immunol Methods** n. 265, 2002.

DEGTEREV A, YUAN J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 9(5), p. 378-390, 2008.

DELPRETE, S.A., MAURER, L.H. O'DONNELL, J. Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine and tamoxifen in metastatic melanoma. **Cancer Treat Rep** v. 68, p. 1403-1405, 1984.

DIAS, N. & BAILLY, C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. **Biochem Pharmacol** v. 70, p. 1-12, 2005.

DIMRI GP. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell** v. 7, 505-512, 2005.

DODO, K., MINATO, T., *et al.* Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. **Bioorg Med Chem** v.16(17), p. 7975-7982, 2008.

DORA C.L., ALVAREZ-SILVA M., *et al.* Evaluation of antimetastatic activity and systemic toxicity of camptothecin-loaded microspheres in mice injected with B16F10 melanoma cells. **J. Pharm Pharmacol Sci** v. 9(1), p. 22-31, 2006.

DOWNING, J.R. & SHANNON, K.M. Acute leukemia: a pediatric perspective. **Cancer Cell** v. 2(6): 437-45, 2002.

DREHER, D. & JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur J Cancer**. v. 32 (A), p. 30-38, 1996.

EDINGER, A.L., THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr Opin Cell Biol** V. 16(6), 2004.

EWEND, M. G., CAREY, L. A. *et al.* Treatment of melanoma metastases in the brain. **Semin Surg Oncol** v. 12(6), p. 429-435, 1996.

FILOMENI, G., ROTILIO, G. *et al.* Cell signaling and the glutathione redox system. **Biochem Pharmacol** v. 64, p. 1057-1064, 2002.

FIUZA, S., GOMES, C.L., *et al.* Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties a structure activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorg Med Chem** v. 12, p. 3581-3589, 2004

FRANK, L., MEYSKENS, J. *et al.* Redox Regulation in Human Melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res** v. 14, p. 148-154, 2001.

FROM, L., MARRETT, L. *et al.* Screening for skin cancer: a systematic review. **Evidence-based Series** 15-1, section 2, 2007.

GARBE, C. & EIGENTLER, T.K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. **Melanoma Res** v. 17, p. 117-127, 2007.

GARCIA-RUIZ, C. & FERNANDEZ-CHECA, J.C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. **J Gastroenterol Hepatol** v. 3, p. 3-6, 2006.

GHOBRIL, I.M., WITZIG, T.E., ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **C.A Cancer J Clin** V. 55(3), 2005.

- GOKBUGET, N. & HOELZER, D. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. **Rev Clin Exp Hematol** V. 6(2), p. 114-41; discussion 200-2, 2002.
- GOMES, C.A., CRUZ, G., *et al.* Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. **J Med Che.** V. 46, p. 5395-5401, 2003.
- GOTTLIEB, R. A. Role of mitochondria in apoptosis. **Crit Rev Eukaryot Gen Expr** n. 10, 2000.
- GRAY-SHOPFER, V., WELLBROCK, C. *et al.* Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature.** v. 445, p. 851-857, 2007.
- GREENBERG, E.R., BARON, J.A. *et al.* Clinical-trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. **N Engl J Med.** v. 331, p. 141-147, 1994.
- GUERRY, D., SYNNESTVEDT, M. *et al.* Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. **J Invest Dermatol** v. 100, p. 342-345, 1993.
- HAASS, N.K., SMALLEY, K.S.M., *et al.* Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res** v. 18, p. 150-159, 2005.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** New York: Oxford University Press, 2000.
- HART, I.R., BIRCH, M., *et al.* Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. **Cancer Metastasis Rev** v. 10, p. 115-128, 1991.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature.** 407(6805): 770-6, 2000.
- HOLZMANN, B., GOSSLAR, U., *et al.* Alpha 4 integrins and tumor metastasis. **Curr Top Microbiol Immunol** v. 231, p. 125-141, 1998.
- HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell** v. 69, p. 11-25, 1992.
- HYNDOU, K. NISHIKAWA, M., *et al.* Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugate catalase. **Clin Cancer Res** v. 10, p. 7685-7691, 2004.
- HWU, W.J., KROWN, S.E., *et al.* Phase II study of temozolomide thalidomide for the treatment of metastatic melanoma. **J Clin Oncol** p. 3351-3382, 2003.
- INOUE, M., SUZUKI, R., *et al.* Selective induction of cell death in cancer by gallic acid. **Biol Pharm Bull** v. 18(11), p. 526-530, 1995.
- INOUE, M., SAKAGUCHI, N., *et al.* Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. **Biol Pharm Bull** v. 23(10), p. 1153-1157, 2000.
- ISUZUGAWA K, INOUE M, OGIHARA Y. Ca²⁺-Dependent caspase activation by gallic acid derivatives. **Biol Pharm Bull** v. 24(7), p. 844-847, 2001.
- IWASHITA, K., KOBORI, M., *et al.* Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. **Biosc Biotechnol Biochem** v. 64, p. 1813-1820, 2000.
- JEMAL, A., TIWARI, R.C., *et al.* Cancer statistics, 2004. **CA Cancer J Clin** v. 54(1), p. 8-29, jan., 2004.

JOHNSON, J. D. & YOUNG B. Demographics of brain metastasis. **Neurosurg Clin N Am** v. 7(3), p. 337-344, 1996.

JOHNSON, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer and Metastasis Rev** v. 18, p. 345-357, 1999.

<<http://www.jornallivre.com.br/156418/o-que-e-leucemia-linfoide-aguda.html>> Acesso em 16 de julho de 2009.

KASHANI-SABET, M., SAHIKH, L., *et al.* NF- κ B in the vascular progression of melanoma. **J Clin Onc** V. 22(4), p. 617-623, 2004.

KASPER, B., D'HONDT, V., VEREECKEN, P., AWADA, A. Novel treatment strategies for malignant melanoma: A new beginning? **Crit Rev Oncol Hematol USA**, Article in press, 2007.

KAWADA, M., OHNO, Y., *et al.* Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anticancer Drugs** v. 12(10), p. 847-852, 2001.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 1972.

KREUTZ, F.T. O laboratório de biologia tumoral – a cultura de células e xenotransplantes. In: FLECK, J. **Câncer integração clínico biológica**. Rio de Janeiro Medsi, p. 337-352, 1992.

KOCH, A.W., BOZIC, D., PERTZ, O., ENGEL, J. Homophilic adhesion by caderins. **Curr Opin Struct Biol** v. 9, p. 275-281, 1999.

KOLAROVA, H., NEVRELOVA, P., *at al.* In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicol In Vitro** v. 21, p. 249-253, 2007.

KUNTZ, S., WENZEL, U. *et al.* Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur J Nutr** v. 38(3), p. 133-42, 1999.

LAKS, D., LONGHI, F. *et al.* Survival evaluation of children with acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Frankfurt-Munich trial. **J Pediatr** v. 79(2), p. 149-58, 2003.

LASH, L.H. Mitochondrial glutathione transport; physiological, pathological and toxicological implications. **Chem Biol Interact** v. 163(1-2), p. 54-67, 2006.

LÁZARO I, PALACIOS C, GONZÁLEZ M, GONZÁLEZ-PORQUÉ P. Inhibition of human spleen protein tyrosine kinases by phenolic compounds. **Anal Biochem** v.10,225(1), p. 180-183, 1995.

LEAL, P.C. Síntese e avaliação da atividade antifúngica de compostos derivados do ácido gálico. 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2004

LEE, M. G., LEE, K. T. *et al.* Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. **Biol Pharm Bull** v. 24, p. 3003-306, 2001.

LEE, M.L., TOMSU, K., *et al.* Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. **Melanoma Res** v. 10(81), p. 154-160, 2000.

- LEE, Y. J., ERDOS, G., *et al.* Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. **Mol Cell Biochem** v. 137(2), p. 141-54, 1994.
- LEE, C., BAEHRECKE, E.H. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. **Development** v. 128, p. 1443-1445, 2001.
- LEGHA, S.S., RING, S., ETON, O. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin vinblastine, decarbazine, interferon alfa and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. **J Clin Oncol** p. 1752-1759, 1998.
- LENS, M.B. & DAWES, M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. **Br J Dermatol** v. 150, p. 179-185, 2004.
- LEPLEY, D.M., LI, B., *et al.* The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. **Carcinogenesis** v. 17(11), p. 2367-75, 1996.
- LEPLEY, D.M. & PELLING, J.C. Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. **Mol Carcinog** v. 19(2), p. 74-82, 1997.
- LESZCZYŃIECKA, M., ROBERTS, T., *et al.* Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. **Pharmacol Ther** v. 90, p. 105-156, jun., 2001.
- LOOS, B., ENGELBRECHT, A.M. Cell death: a dynamic response concept. **Autophagy** v. 5(5), p. 590-603, 2009.
- LOPES, L. F. Marcadores moleculares nas leucemias linfocíticas agudas. **Rev Bras Hematol Hemoter** v. 22(2), p. 166-168, 2000.
- LU, Z., NIE, G., BELTON, P.S., *et al.* Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochem Internat** v. 28, p. 263-274, 2006.
- LUI, P., CASHIN, R. *et al.* Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer Treat** p. 1-16, 2007.
- LUM, J.J., DEBERARDINIS, R.J., THOMPSON, C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol** v.6, p. 439-448, 2005.
- MARKOVIC, S.N., GEYER, S.M., *et al.* A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. **Cancer** v. 103, p. 2584-2589, 2005.
- McCONKEY, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicol Lett** v. 99, p. 157-168, 1998.
- McGARY, E.C., LEV, D.C., *et al.* Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. **Cancer Biol Ther** v. 1(5), p. 459-465, 2002.
- McKERNAN, T.M., WOODS, E.B., *et al.* Uptake of glutathione by renal cortical mitochondria. **Arch Biochem Biophys** v. 288, p. 653-663, 1991.
- MEHTA, A.C., LABER, D.A., *et al.* A phase II study of temozolomide and thalidomide in the treatment of advanced melanoma. **Proc Am Soc Clin Oncol** p. 351-379, 2003.
- MEYSKENS, F.L., JR, BUCKMEIER, J.A., *et al.* Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress. **Clin Cancer Res** v.5(5), p. 1197-202, 1999.

- MEYERS, M.L., BALCH, C.M. Diagnosis and treatment of metastatic melanoma. In: BALCH, C.M., HOUGHTON, A.N., SOBER, A.J., SOONG, S. **Cutaneous Melanoma**. Saint Louis, Quality Medical Publishing. P. 325-372, 1998.
- MIDDLETON, M.R., GROB, J.J., *et al.* Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **J Clin Oncol** p. 158-172, 2000.
- NAVARRO, J., OBRADOR, E., *et al.* Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth in vivo. **Free Radic Biol Med** v. 23(3-4), p. 410-418, 1999.
- NATALI, P.G., HAMBY, C.V., *et al.* Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in the cutaneous malignant melanoma lesions. **Cancer Res** v. 57, p. 1554-1560, 1997.
- NESBIT, M. & HERLYN, M. Adhesion receptors in human melanoma progression. **Invasion Metastasis** v. 14, p. 131-146, 1994.
- NETLAND, P.A., ZETTER, B.R. Organ specific adhesion of metastatic tumor cells in vitro. **Science** v. 224, p. 1113-1115, 1984.
- OBERHAMMER, F., WILSON, J. W., *et al.* Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. **Embo J** v.12(9): 3679-84, 1993.
- OHNO, T., INOUE, M., OGIHARA, Y. Cytotoxic activity of gallic acid against liver metastasis of mastocytoma cells P-815. **Anticancer Res** v. 21(6A), p. 3875-3880, 2001.
- OHNO, Y., FUKUDA, K., *et al.* Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. **Anticancer Drugs** v. 10(9), p. 845-851, 1999.
- OKADA, H., MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer** v. 4, p. 592-603, 2004.
- ORTEGA, A., FERRER, P., *et al.* Down-regulation of glutathione and Bcl-2 synthesis in Mouse B16 melanoma cells avoids their survival during interaction with the vascular endothelium. **J Biol Chem** v. 278, n. 41, p. 39591-39599, 2003.
- OZÖREN, N., EL-DEIRY, W.S. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. **Semin Cancer Biol** v. 13 n. 2, 2003.
- OW, Y.Y., STUPANS, I. Gallic acid and gallic derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Curr Drug Metab** v. 4(3), p. 241-248, 2003.
- PARKIN, D.M., WHELAN, S.L., FERLAY, J., TEPPA L., THOMAS D.B. **Cancer Incidence in Five Continents** v. VIII. n. 155 International Agency for Research on Cancer Lyon, France, 2002.
- PAROLI, M.B., REASON, I. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq Gastroenterol** v. 38, n. 2, 2001.
- PASTORE, A., FEDERICI, E., *et al.* Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chem Acta** v. 333, p. 19-39, 2003.
- PATEL, T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clin Liver Dis** v. 4, 2000.
- PEJOVIC, T., SCHWARTZ, P.E. Leukemias. **Clin Obstet Gynecol** v. 45, p. 866-878, 2002.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **J Cell Mol Med** v. 8(4), 2004.

PIRO, L. D. Apoptosis, Bcl-2 antisense, and cancer therapy. **Oncol Basel** v. 18, p. 5-10, 2004.

PLASSCHAERT, S. L., KAMPS, W. A., *et al.* Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treat Rev** v. 30(1), p. 37-51, 2004.

POPAT, U., CARRUM, G. *et al.* Haemopoietic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukaemia. **Cancer Treat Rev** v. 29(1), p. 3-10, 2003.

POSTE G., DOLL J., HART I.R., FIDLER I.J. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. **Cancer Res** v. 40, p. 1636-1644, 1980.

PROJETO DIRETRIZES. Dagnóstico e Tratamento do melanoma cutâneo. **Associação Média Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2002.

PUI, C. H., EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med** v. 339, p. 605-615, 1998.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. **Curr Opin Oncol** v. 11(1), p. 68-75, 1999.

REGULA, K. M., ENS, K., *et al.* Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. **J Mol Cell Cardiol** v. 35(6), p. 559-67, 2003.

RHODES, A. R. Cutaneous melanoma and intervention strategies to reduce tumor-related mortality: what we know, what we don't know, and what we think we know that isn't so. **Dermatol Therapy** v. 19, p. 50-69, 2006.

RIBAS, A., CAMACHO, L. H., LOPEZ-BERESTEIN, G. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte associate antigen-4 monoclonal antibody CP-675,206. **J Clin Oncol** v. 23, p. 8968-8977, 2005.

RICCI, M.S, ZONG, W.X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist** v. 11, p. 342-357, 2006.

RIKER, A.I., GLASS, F. *et al.* Cutaneous melanoma: methods of biopsy and definitive surgical excision. **Dermatol Ther** v. 18, p. 387-393, 2005.

RIVOLTINI, L., CASTELLI, C., *et al.* Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. **J Immunol** v.171, p. 3467-3474, 2003.

ROSSO, R., VIEIRA, T. O., *et al.* Relationship between the lipophilicity of gallic acid *n*-alquil esters`derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorg Med Chem** v. 14, p. 6409-6413, 2006.

ROSSO, R. Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados éteres do ácido gálico, 2005, 146 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2005

ROY, G., LOMBARDÍA, M., *et al.* Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by lauryl gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231. **Arch Biochem Biophys** v. 383(2), p. 206-214, nov., 2000

RYAN, K.M., ERNST, M.K., *et al.* Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. **Nature** v. 20,404(6780), p. 892-897, 2000.

SABKI, K., YUO, A., *et al.* Apoptosis-Inducing Activity of Lipid Derivatives of Gallic Acid. **Biol Pharm Bull** v. 23(1), p. 1391-1394, 2000.

SACKMANN-MURIEL, F., FELICE, M. S., *et al.* Treatment results in childhood acute lymphoblastic leukemia with a modified ALL-BFM'90 protocol: lack of improvement in high-risk group. **Leuk Res** v. 23(4), p. 331-40, 1999.

SAKAGUCHI, N., INOUE, M., *et al.* Cell death-inducing activity by gallic acid derivatives. **Biol Pharm Bull** v. 22(5), p. 471-475, 1999.

SAVI, L.A., LEAL, P.C., VIEIRA, T.O., *et al.* Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetics alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung** v. 55(1), p. 66-75, 2005.

SCAMBIA, G., RANELLETTI, F. O., *et al.* Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. **Int J Cancer** v. 54(3), p. 462-6, 1993.

<www.sci.sdsu.edu/...Exam_keys/image5.jpg> Acesso em 13 de outo de 2004.

SCHRAPPE, M., CAMITTA, B. *et al.* Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** v. 14(12), p. 2193-4, 2000.

SEEGENSCHMIEDT, M.H., KEILHOZ, L., ALTENDORF-HOFMANN, A. Palliative radiotherapy for recurrent and metastatic malignant melanoma: prognostic factors for tumor response and long-term outcome: a 20 year experience. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** p. 607-618, 1999.

SEERAM, N.P., ADAMS, L.S., *et al.* In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **J Nutr Biochem** v. 16(6), p. 360-367, 2005.

SERGEDIENE, E.; JONSSON, K.; *et al.* Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. **FEBS Lett** v. 462, p. 392-396, 1999.

SERRANO, A., PALACIOS, C., *et al.* Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell line and inhibit lymphocyte proliferation. **Arch Biochem Biophys** v. 350(1), p.49-54, 1998.

SERRONE, L., ZEULI, M., *et al.* Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: the year experience overview. **J Exp Clin Cancer Res**, p. 119-121, 2000.

SHEN, P. WANCK, L.A., MORTON, D.L. Is adjuvant radiotherapy necessary after positive lymph node dissection in head and neck melanomas? **Annu Surg Oncol** v. 7, p. 554-559, 2000.

SHIOZAKI, E.N., SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. **Trends Biochem Sci** v. 29(9), 2004.

SKULACHEV, V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis** v.11(4), p. 473-485, 2006.

- SLATER, A.F.G., STEFAN, C., *et al.* Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicol Lett** v. 82-83, p. 149-153, 1995.
- SOMASUNDAR, P., RIGGS, D.R. *et al.* Inhibition of melanoma growth by hemocyanin occurs via early apoptotic pathways. **Am J Surg** v.190, p. 713-716, 2005.
- SONG, S.Y., NOMIZU, M., YAMADA, Y., KLEINMAN, H.K. Liver metastasis formation by laminin-1-peptide (LQVQLSIR) adhesion select B16F10 melanoma cells. **Int J Cancer** v. 71, p. 436-441, 1997.
- SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell** v. 79, p. 301-314, 1994.
- STANFORD M. M., SHABAN M., BARRETT J. W., *et al.* Myxoma virus oncolysis of primary and metastatic B16F10 mouse tumors in vivo. **Am Soc Gene Ther** v. 16(1), p. 52-59, 2008.
- SYLVESTER, P. W. Vitamin E and apoptosis. **Vitam Horm** v. 76, p. 329-356, 2007.
- TAKAHASHI, T., BABA, M., *et al.* Cyclooxygenase-2 plays a suppressive role for induction of apoptosis in isoliquiritigenin-treated mouse colon cancer cells. **Cancer Lett** v. 231, p. 319-325, 2006.
- TAMMELA, P., LAITINEN, L., *et al.* Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. **Arch Biochem Biophys** v.15;425(2), p. 193-199, 2004.
- TARHINI, A. A., AGARWALA, S. S. Novel agents in development for treatment of melanoma. **Expert Opin Investig Drugs** v. 14, p. 885-892, 2005.
- TENTORI, L., LEONETTI, C., *et al.* Poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor as chemosensitizer of malignant melanoma for temozolomide. **Eur J Cancer** v.41, p. 2948-2957, 2005
- THOMPSON, E.B. The many roles of c-Myc apoptosis. **Annu Rev Physiol** n. 60, 1998.
- TING, J.P., WILLINGHAM, S.B., BERGSTRAHL, D.T. NLRs at the intersection of cell death and immunity. **Nat Rev Immunol** v. 8(5), p. 372-379, 2008.
- UMANSKY, V., ROCHA, M., *et al.* Glutathione is a factor of resistance of jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis. **J Cell Biochem** v. 78, p. 578-587, 2000.
- VALKO, M., RHODES, C.J., *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact** v. 160, p. 1-40, 2006.
- VAN der HEIJDEN, C.A., JANSSEN, P.J., STRIK, J.J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food Chem Toxicol** v. 24, p.1067-1070, 1986.
- VERMEULEN, K., BERNEMAN, Z.N., VAN BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif** n. 36, 2003.
- VIANA, M. B., MURAO, M., *et al.* Malnutrition as a prognostic factor in lymphoblastic leukaemia: a multivariate analysis. **Arch Dis Child** V. 71(4), p. 304-10, 1994.
- ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A., *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J Exp Med** v. 183, p. 1533-1544, 1996.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. Cap 23. p. 489-516.

YANG, F., OZ, H.S., BARVE, S., *et al*. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. **Mol Pharmacol** v.60(3), p. 528-533, 2001.

YAO, Z., CHE, X., *et al*. Inhibition by tyrosinase (YSL) on the invasion and adhesion of the mouse melanoma cell. **Mol Med** v.13 (1-2), p. 14-21, 2007.

WAGNER, J.D., GORDON, M.S., CHUANG, T.Y., COLEMAN, J.J. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plast Reconstr Surg** v. 105, p. 1774-1799, 2000.

WAGNER, G. WISS, D.F. Cell surface adhesion receptors. **Curr Opin Struct Biol** v. 4, p. 841-851, 1994.

WALDMANN, V., BOCK, M., *et al*. Pathogenesis of malignant melanoma. **Mol Biol Aspect** v 50(6), p. 398-405, 1999.

WALKER, P. R., LEBLANC, J., *et al*. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. **Methods** v. 17(4), p. 329-38, 1999.

WANG, Z. Y., CHEN, Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. **Lancet Oncol** v. 1, p. 101-106, 2000.

WANG, W. & BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharm Reviews** v. 50(3), p. 335-355, 1998.

WANG, Y., ZHOU, B., *et al*. Inhibitors of 5-lipoxygenase inhibit expression of intercellular adhesion molecule-1 in human melanoma cells. **Acta Pharmacol Sin** v. 25, p. 672-677, 2004.

WEAVER, B.A., CLEVELAND, D.W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell** v. 8, p. 7-12, 2005.

WHO - World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <[http: www.who.int/cancer](http://www.who.int/cancer)>, Acesso em 25 nov. 2007.

WÜNSCH-FILHO,V., MONCAU, J.E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Rev Assoc Med Bras** v. 48(3), p. 250-257, 2002.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. **Anticancer Res** n. 5, 1985.

8. ANEXOS

8.1 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

ROSSO, Rober; LOCATELLI, Claudriana; LCINIO, Marlei; de SOUZA, Camila; SANTOS-SILVA, Maria Cláudia; LEAL, Paulo Cezar; YUNES, Rosendo; NUNES, Ricardo; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz. Influence of glutathione depletion and NF- κ B inhibition on the cytotoxic effect of n-alkyl-esteres of gallic acid in L1210 leukemic cells. In: IV Meeting of the south American group of the society fo free radical biology and medicine, 2005. Águas de Lindóia, 2005.

HANGAI, Mirela; LOCATELLI, Claudriana; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz; SANTOS - SILVA, Maria Cláudia. Citotoxic effects of nitrogen monoxide donors on leukemic lymphoblastic cells. In: Second workshop on comparative aspects of oxidative stress in biological systems, 2005, La Paz. Annais the Second Workshp on comparative aspects of oxidative stress in biological systems, 2005.

LEITE, Daniela; FERREIRA, Samira; LOCATELLI, Claudriana; SANTOS - SILVA, Maria Cláudia. O mecanismo de resistência das células leucêmicas U-937 ao taxol não envolve a atividade da Glicoproteína P (MDR1).. In: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia. FESBE, 2005.

SANTOS, Patricia; LOCATELLI, Claudriana; MIRI, Ana Paula; DUARTE, Leandro; FARIA, Moacir. Avaliação dos efeitos de compostos fitoterápicos utilizados como emagrecedores. In: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia. FESBE, 2005.

LOCATELLI, Claudriana; LEAL, Paulo César ; SANTOS - SILVA, Maria Cláudia; YUNES, Rosendo; NUNES, Ricardo; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz. Citotoxic effect of gallic acid derivatives on melanoma cell line. In: Sociedade Brasileira do Progresso da Ciência, 2006, Florianópolis. 58a Reunião Anual da SBPC, 2006.

LOCATELLI, Claudriana; FRITZEN, Márico; SANTOS - SILVA, Maria Cláudia; LEAL, Paulo César; YUNES, Rosendo; NUNES, Ricardo; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz. Gallic Acid Derivatives induce apoptosis on melanoma cell line. In: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia. XXXV Annual Meeting Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.

LOCATELLI, Claudriana; NAVARINI, Andréia L. F.; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B.; LEAL, Paulo C.; YUNES, Rosendo A.; Gallic acid esters derivatives induce apoptosis in melanoma cells by GSH depletion and promote inhibition of cell adhesion. In: Reunião Latinoamericana de Química Medicinal 1ª, 2007, Montevideo. Anais da 1ª Reunião Latinoamericana de Química Medicinal, 2007, v. 1, p. 50.

NAVARINI, Andréia L. F.; LOCATELLI, Claudriana; CHIARADIA, Louise D.; MASCARELLO, Alessandra; NUNES, Ricardo José; YUNES, Rosendo A.; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B. Citotoxic effect of synthetic hydroxychalcones on melanoma cells. In: Reunião Latinoamericana de Química Medicinal 1ª, 2007, Montevideo. Anais da 1ª Reunião Latinoamericana de Química Medicinal, 2007, v. 1, p. 46.

NAVARINI, Aandréia Lilian Formento ; LOCATELLI, Claudriana; Chiaradia, Louise; Mascarello, Alessandra; NUNES, Ricardo; YUNES, Rosendo; CRECZYNSKI - PASA, Tânia Beatriz. Hydroxychalcones induce apoptosis in melanoma cells by oxidative stress generation. In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia - SP. XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008.

LOCATELLI, Claudriana ; LEAL, Paulo César ; YUNES, Rosendo; NUNES, Ricardo; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz. Oxidative stress associated with apoptosis induced in melanoma cell line gallic acid ester derivatives. In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia - SP. XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008.

8.2 DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO

LOCATELLI, Claudriana; FRITZEN, Márcio; NAVARINI, Andréia L. F.; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B. Novas perspectivas para o tratamento de melanoma. In: Seminário de Desenvolvimento de Pesquisa da UnC, 2006, Caçador. **Anais.XXX..** Caçador, 2006, 1 CD-ROM.

GEREMIAS, Reginaldo; CURY PEDROSA, Rosangela ; LOCATELLI, CLaudriana; de Fávere; CURI PEDROSA Roberto; LARANJEIRAS, Mauro. Lipid lowering activity of hydrosoluble chitosan and association with Aloe vera L. and Brassica olearaceae L.. *Phytotherapy Research*, v. 20, p. 288-293, 2006.

LOCATELLI, Claudriana ; FRITZEN, Márcio ; SANTOS - SILVA, Maria Cláudia ; LEAL, Paulo Cezar; NUNES, Ricardo; YUNES, Rosendo; FERREIRA - PEREIRA, Antônio; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz Efeito Citotóxico de derivados do ácido gálico sobre linhagem de células de melanoma e capacidade de inibição da atividade da proteína de resistência a múltiplas drogas - glicoproteína-P. In: XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM, 2006, Campinas. XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM, 2006.

GEREMIAS, R.; PEDROSA, R. C.; LOCATELLI, C.; DE FÁVERE, V. T.; CORY-PEDROSA, R.; LARANJEIRA, M. C. M. LIPID LOWERING ACTIVITY OF HYDROSOLUBLE CHITOSAN AND ASSOCIATION WITH ALOE VERA L. AND BRASSICA OLEARACEAE L. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, V. 20, P. 288-293, 2006.

LOCATELLI, Claudriana ; SEIDEL, Mariana ; SANTOS, Patricia. Humanização da Assistência a Saúde - um meio de transformar o atendimento ao paciente. In: Curso de Humanização da Assistência a Saude um meio de transformar o atendimento ao paciente, 2007, Caçador. Curso de Humanização, 2007.

RISSATTO, Jabel João; Ferrareze, Cárita; LOCATELLI, Claudriana . Atividade antioxidante in vitro de sucos de tomate e berinjela. In: XI SEDEPE - Seminário de desenvolvimento da pesquisa docente e dscente, 2007, Caçador. O conhecimento que produzimos - XI SEDEPE, 2007.

LOCATELLI, Claudriana ; CRECZYNSKI - PASA, Tânia Beatriz. Apoptose - importante via de atividade antitumoral. In: XI SEDEPE - Seminário de

Desenvolvimento da Pesquisa Docente e Discente, 2007, Caçador. O conhecimento que produzimos - XI SEDEPE, 2007.

LOCATELLI, C.; de Carvalho, D.R. Avaliação da atividade antitumoral in vitro e antimetastática in vivo do tetradecil galato. In: I Seminário integrado de pesquisa e extensão universitária - SIPEX, 2009, Mafra. Anais I Seminário integrado de pesquisa e extensão universitária - SIPEX, 2009.

LOCATELLI, C.; de SOUZA, M.C. Avaliação da associação de ácido ascórbico/sulfato ferroso em ratos tratados subcranicamente. In: I Seminário Integrado de Pesquisa e Extensão Universitária - SIPEX, 2009, Mafra. Anais I Seminário Integrado de Pesquisa e Extensão Universitária - SIPEX, 2009.

8.2.1 Participação em Bancas de Trabalhos Conclusão de Curso

SEIDEL, Mariana; LOCATELLI, Claudriana. Participação em banca de Fabiano Lenz e Ismael Raven Padilha. Uso de hipoglicemiante glibenclamida e do anti-hiperglicemiante metformina no controle da glicemia. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado

LAZARIS, Rosane; ZANELA, Claiton; LOCATELLI, Claudriana. Participação em banca de Adriane Guareski. Disfunção erétil: etiologia, diagnóstico e tratamento. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

OKUYAMA, Michiko; SOUZA, Michel Tomaz; LOCATELLI, Claudriana. Participação em banca de Michelle Sabrine Creminácio e Simone Roberta Orlandi. Isolamento e identificação dos compostos isolados da fração de acetona do extrato metanólico das cascas de Matayba elaeagnoides Radlk. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

SEIDEL, Mariana; LOCATELLI, Claudriana. Participação em banca de Francieli Soligo e Talita Bolsonello. Automedicação na terceira idade no município de Rio das Antas. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

SEIDEL, Mariana; SANTOS, Patricia; LOCATELLI, Claudriana. Participação em banca de Amanda Schmidt e Cristiane Ap. Chaves. Abordagem terapêutica do vírus Influenza. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

CRECZINSKY-PASA, Tânia Beatriz; FRITZEN, Márcio; Ramos, Betina; LOCATELLI, Claudriana. Participação em banca de Tiago Opala Vieira. Avaliação do potencial, anti-tumoral do azul de metileno em células de melanoma: incorporado em lipossomos e ação fotodinâmica. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina.

LOCATELLI, C.; SEIDEL, M.; ZANCANARO, V. Participação em banca de Jaqueline Casagrande e Patricia Andréa Koch. Assistência farmacêutica na saúde pública em pacientes com diabetes mellitus e dislipidemias. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

SANTOS, P.; LOCATELLI, C.. Participação em banca de Karini Maitelli e Kátia Horn. Doença de Alzheimer. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

BREHMER, J.S; LOCATELLI, C. Participação em banca de Jacqueline Reichert Alexi. Estudo da ação antitumoral do extrato bruto da *Persea cordata* no desenvolvimento do tumor ascítico de Erlich. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

ZANCANARO, V.; LOCATELLI, C.; SANTOS, P. Participação em banca de Ana Maria Werner. Atenção farmacêutica familiar: acompanhamento de pacientes hipertensos. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

SANTOS, P.; LOCATELLI, C.; FOPPA, T. Participação em banca de Simara Teixeira. Eficácia na utilização crônica de Chá verde (*Camelia sinesis*) na redução do colesterol total, triglicerídeos plasmáticos e índice de massa corporal em pacientes. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

FOPPA, T.; LOCATELLI, C. Participação em banca de Marina Ribeiro. A microencapsulação na tecnologia farmacêutica. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

BREHMER, J.S; LOCATELLI, C. Participação em banca de Décio Medeiros. AÇÃO ANTITUMORAL DO QUIMIOTERÁPICO XELODA (CAPECITABINA) DINAMIZADO PELO MÉTODO HOMEOPÁTICO HANEMANIANO, TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE) EM CAMUNDONGOS. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

BREHMER, J.S; LOCATELLI, C. Participação em banca de Eliane Biliski da Silva. Estudo da ação antitumoral da Musa paradisiaca no tumor ascítico de Ehrlich. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

MOLZ, S.; LOCATELLI, C. Participação em banca de Fabiana Kalyne Ludka. Avaliação do efeito neuroprotetor do ácido docosahexaenóico (DHA) em fatias de hipocampo de camundongos submetidas a um modelo de isquemia química. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado.

8.2.2 Participação em Banca de Comissão Julgadora

HOFF, Sandino; ELICKER, Ildo; ATOLINI, Izolema.; LOCATELLI, Claudriana. Comissão para atuar no Processo Seletivo de Docentes. 2005. Universidade do Contestado.

8.2.3 Orientação de Monografia de Curso de Especialização

VILMAIR ZANCANARO. Prevalência de Enteroparasitoses nos alunos de primeira a quarta série do colégio CAIC localizado no bairro Martelo - Caçador - SC. 2006. 42 f. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização Em Análises Clínicas) - Universidade Comunitária Regional de Chapecó. Orientador: Claudriana Locatelli.

Erlete Maria Battochio Horn. Plantas Medicinais. 2005. 80 f. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização Em Biologia Econômica) - Universidade do Contestado. Orientador: Claudriana Locatelli.

8.2.4 Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso

Morgana Jasko. Interferências do propranolol e captopril nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos: estudo in vitro. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Universidade do Contestado. Orientador: Claudriana Locatelli.

8.2.5 Orientação de Iniciação Científica na UnC

Fabricio de Nardi. Avaliação do uso da casca de maracujá sobre os níveis de glicose e lipídeos plasmáticos e sua interferência no peso e na atividade das enzimas amilase e lipase. 2005. 53 f. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Universidade do Contestado. Orientador: Claudriana Locatelli.

Katia Zago. Avaliação da toxicidade hepática e renal em ratos tratados com associação de fitoterápicos utilizados como emagrecedores. 2005. 0 f. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Universidade do Contestado, Fundo de Apoio a Pesquisa. Orientador: Claudriana Locatelli.

Fabricio Tortelli. Incidência de fatores de risco cardiovasculares em funcionários da UnC - Caçador. 2005. 0 f. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Universidade do Contestado, Fundo de Apoio a Pesquisa. Orientador: Claudriana Locatelli

Jabel João Rissato. Avaliação da atividade antioxidante in vitro de sucos de tomate, berinjela e vitaminas A, C e E. 2007. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Fundação Universidade do Contestado - Campus Caçador, Fundo de Apoio a Pesquisa. Orientador: Claudriana Locatelli.

Deborah Regina de Carvalho. Avaliação da atividade antitumoral in vitro e antimetastática in vivo do tetradecil galato. Início: 2008. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Fundação Universidade do Contestado - Campus Caçador, Fundo de Apoio a Pesquisa. Orientador: Claudriana Locatelli – em andamento.

Murilo Chiarelo de Souza. Avaliação da toxicidade da associação ácido ascórbico/sulfato ferroso em ratos tratados subcronicamente. Início: 2008. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Fundação Universidade do Contestado - Campus Caçador, Fundo de Apoio a Pesquisa. Orientador: Claudriana Locatelli – em andamento.

Murilo Chiarello de Souza. Dosagem de fenóis totais, carotenóides e vitamina C e avaliação da atividade antioxidante de diferentes sucos. Início: 2009. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Universidade do Contestado, Fundo de Apoio a Pesquisa. (Orientador).

Raquel Jasper. Avaliação da toxicidade do agrotóxico glifosato em camundongos. Início: 2009. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Universidade do Contestado, Fundo de Apoio a Pesquisa. (Orientador).

Deborah Regina de Carvalho. Avaliação da toxicidade do tetradecil galato em camundongos. Início: 2009. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Universidade do Contestado, Fundo de Apoio a Pesquisa. (Orientador).